

PCT/JPGG/06314

日 本 国 特 許 庁

14.09.00

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

10/088724

JP00/6314

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1999年 9月17日

REC'D 06 NOV 2000

出 願 番 号
Application Number:

平成11年特許願第264679号

WIPO PCT

出 願 人
Applicant (s):

学校法人慶應義塾

PRIORITY
DOCUMENT

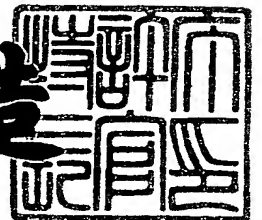
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

4

2000年10月20日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3085379

【書類名】 特許願
 【整理番号】 KUV-102
 【提出日】 平成11年 9月17日
 【あて先】 特許庁長官 殿
 【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区若宮町 1 5 蔭田 1 0 1

【氏名】 西本 育夫
 【特許出願人】
 【識別番号】 598121341
 【氏名又は名称】 学校法人慶應義塾
 【代理人】

【識別番号】 100102978
 【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】
 【識別番号】 100108774
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 041092
 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 神経細胞死を抑制するポリペプチド、Humanin

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記 (a) または (b) に記載のポリペプチド。

(a) 配列番号：4 または 6 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

~~(b) 配列番号：4 または 6 に記載のアミノ酸配列において、1 または数個のア~~
ミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列
番号：4 または 6 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと機能的に同等な
ポリペプチド。

【請求項 2】 請求項 1 に記載のポリペプチドと他のポリペプチドとの融合
ポリペプチド。

【請求項 3】 請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドをコードする DNA

。

~~【請求項 4】 請求項 3 に記載の DNA が挿入されたベクター。~~

【請求項 5】 請求項 4 に記載のベクターを保持する宿主細胞。

【請求項 6】 請求項 5 に記載の宿主細胞を培養し、発現させたポリペプチ
ドを該宿主細胞またはその培養上清から回収する工程を含む、請求項 1 または 2
に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項 7】 請求項 1 に記載のポリペプチドを神経細胞に接触させる工程
を含む、神経細胞死を抑制する方法。

【請求項 8】 請求項 1 に記載のポリペプチドまたは請求項 4 に記載のベク
ターを有効成分とする医薬組成物。

【請求項 9】 神経細胞死抑制剤である、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】 神経変性を伴う疾病の予防または治療に用いられる、請求
項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】 アルツハイマー病の予防または治療に用いられる、請求項
8 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】 請求項 1 に記載のポリペプチドに結合する抗体。

【請求項 13】 配列番号：3 に記載の塩基配列からなる DNA またはその

相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含む、請求項1に記載のポリペプチドをコードするDNAの検出または操作に用いられるDNA。

【請求項14】 請求項1に記載のポリペプチドに結合する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 該ポリペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 該ポリペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、

(c) 該ポリペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、アルツハイマー病に関連する細胞死から神経細胞を保護するポリペプチドに関する。

【0002】

【従来の技術】

アルツハイマー病(Alzheimer's disease; AD)は現在最も精力的に研究されている神経変性疾患であり、臨床的には進行性の記憶喪失および認知障害、病理学的には広範囲の神経喪失、神経細胞内集積物(intraneuronal tangles)、およびコンゴレッドに高親和性の核(congophilic dence core)を持つ細胞外老人斑により特徴付けられる。ADに対する効果的な治療方法は未だ存在しない。進行性の神経細胞喪失により、この疾患の臨床発現の全てではないにしろ、その多くを説明できることが一般に受け入れられており、ADにおける神経細胞死発症の病理機構を解明し、これを防ぐことは、これまでにない新規なAD治療法を確立するために必須である。

【0003】

早発性の家族性AD(FAD)の原因遺伝子としては、4つの異なるグループ: V642I/F/G APP(数字は695アミノ酸を持つAPPであるAPP₆₉₅のもの)、KM595/596NL APP(NL-APP)、プレセニリン(PS)-1変異体、およびPS-2変異体が存在する。本発明者らは、APPの3つのV642型変異cDNAを神経細胞株F11に一過的に発現

させた時の観察に基づき、これらのFAD遺伝子群が、神経細胞の細胞死を引き起こし得ることを示す証拠を初めて見出した (Yamatsuji, T. et al. (1996) *Science* 272, 1349-1352)。この観察は、初代培養神経や不死化神経細胞株を用いた他のグループによる実験によっても確認された (Zhao, B. et al. (1997) *J. Neurosci. Res.* 47, 253-263; Bursztajn, S. et al. (1998) *J. Neurosci.* 18, 9790-9; Luo, J. J. et al. (1999) *J. Neurosci. Res.* 55, 629-42)。それに続き Wolozinらは、FAD関連変異 N141I PS-2 が PC12 細胞において有意に細胞死の比率を高めること (Wolozin, B. et al. (1996) *Science* 274, 1710-1713)、そしてFAD関連変異 PS-1 が、Tリンパ球のアポトーシスを誘導すること (Wolozin, B. et al. (1998) *Neurobiol. Aging* 19, S23-27) を見出した。変異PS-1 が、神経細胞死を直接刺激する (Weihl, C. C. et al. (1999) *J. Neurosci.* 19, 5360-9) のか、または神経細胞死に対し効果を持たない (Bursztajn, S. et al. (1998) *J. Neurosci.* 18, 9790-9) のかどうかは、議論の余地が残されているものの、APPおよびPS-2のFAD関連変異が神経細胞死を引き起こすことに疑問の余地はない。さらに、PS-1についても、 $A\beta$ 添加や栄養因子(trophic factor) の欠乏により誘導される神経細胞死の感受性が、PS-1変異体の発現により上昇すること (Guo, Q. et al. (1996) *Neuroreport* 8, 379-83; Zhang, Z. et al. (1998) *Nature* 395, 698-702; Guo, Q. et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 4125-30)、また、野生型PS-1を過剰発現するトランスジェニックラットに由来する培養皮質神経は、非トランスジェニックのコントロールに比べ、栄養因子欠乏による細胞死に対する感受性が高まる (Czech, C. et al. (1998) *Neuroscience* 87, 325-36) ことなどが繰り返し観察されている。従って、既知の4種のFAD遺伝子 (V642型変異APP、NL-APP、PS-1変異体、およびPS-2変異体) の全てが、神経細胞死を誘導するか、または特定の条件下で他の細胞死刺激に対する神経細胞の傷害性を増強させている可能性が高い。ゆえに、AD治療法の開発に最も重要な鍵は、培養神経細胞で観察されるAD遺伝子により誘導される細胞死を抑制できる分子を探し出すことであると考えられる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、アルツハイマー病に関連する細胞死から神経細胞を保護するポリペプチドおよびその利用を提供することを課題とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者はこれまでに、家族性アルツハイマー病型変異 V642I アミロイド前駆体蛋白質 (V642I APP) を誘導的に発現する神経細胞系 (F11/EcR/V642I) を確立している (国際出願番号 PCT/JP99/04771参照)。この系では、V642I APPが F11神経細胞においてエクダイソン処理に応答して発現する。F11/EcR/V642I 細胞をエクダイソンと2～3日インキュベートすることにより、ほぼ全ての細胞が細胞死を起こすが、コントロールのインキュベーションではごく少数の細胞が細胞死を起こすに過ぎない。本発明者は、このF11/EcR/V642I 細胞を、V642I APPにより誘導される神経細胞に対するアンタゴニストとして作用する遺伝子の検索に利用した。

【0006】

アルツハイマー病 (AD) 患者脳より構築した発現cDNAライブラリーをトランスフェクションして、V642I APP による神経細胞死から生き残った細胞を選択するデストラップ法によるスクリーニング操作を繰り返すことにより、V642I APP による神経細胞死を保護する新規な遺伝子を同定することに成功した。Humanin cDNAと名づけられたこのクローンは、新規な24アミノ酸のポリペプチドをコードしており、ADに関連する神経細胞死、すなわち V642I APP、KM595/596NL APP、M146L プレセニリン(PS)-1、および N141I PS-2 により誘導される神経細胞死をレスキューすることが判明した。これに対し、ハンチントン病/脊髄小脳性運動失調症 (spinocerebellar ataxia) (HD/SCA) に関連したポリグルタミンリピート Q79 や、家族性筋萎縮性側索硬化症 (familial amyotrophic lateral sclerosis; FALS) に関連した SOD1 変異体による神経毒性に対しては効果を示さなかった。Humanin cDNAを神経細胞にトランスフェクションしたところ、転写され予想されるペプチドが産生された後、培養上清に分泌され約10 μ Mのレベルに達した。この培養上清には、V642I APPによる神経細胞死からの有意な保護を示すのに十分な活性が含まれていた。合成 Humanin ポリペプチドもまた、同様の用量一

応答特性で4種のAD遺伝子に対する神経保護作用を示し、1~10 μ Mでその抑制は最大となった。ポリペプチドの構造を変えて活性を試験した結果、8番目のCysと14番目のSerが重要であることが判明した。C8Aの置換はレスキュー活性を完全に欠損させ、S14Gの置換はレスキュー活性を顕著に増加させた。S14Gポリペプチドは、1~10nMで、4種すべてのAD遺伝子からの完全な保護作用を示した。Humaninの抗AD活性は、初代培養皮質神経においても観察され、Humaninにおいては μ Mレベルで、またS14G誘導体においてはnMレベルで、 $A\beta$ が引き起こす細胞死および細胞傷害を保護したが、C8Aにはその活性は見られなかった。これら新規なポリペプチドは、ADの治療薬開発に新たな道を開くと共に、神経細胞死からの保護を目的とするAD治療方法の開発に大きく貢献すると考えられる。

【0007】

本発明は、ADに関連する神経細胞死から細胞を保護する新規なポリペプチドおよびその利用に関し、より具体的には、

- (1) 下記(a)または(b)に記載のポリペプチド、
 - (a) 配列番号：4または6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、
 - (b) 配列番号：4または6に記載のアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：4または6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと機能的に同等なポリペプチド、
- (2) (1)に記載のポリペプチドと他のポリペプチドとの融合ポリペプチド、
- (3) (1)または(2)に記載のポリペプチドをコードするDNA、
- (4) (3)に記載のDNAが挿入されたベクター、
- (5) (4)に記載のベクターを保持する宿主細胞、
- (6) (5)に記載の宿主細胞を培養し、発現させたポリペプチドを該宿主細胞またはその培養上清から回収する工程を含む、(1)または(2)に記載のポリペプチドの製造方法、
- (7) (1)に記載のポリペプチドを神経細胞に接触させる工程を含む、神経細胞死を抑制する方法、

(8) (1)に記載のポリペプチドまたは(4)に記載のベクターを有効成分とする医薬組成物、

(9) 神経細胞死抑制剤である、(8)に記載の医薬組成物、

(10) 神経変性を伴う疾病の予防または治療に用いられる、(8)に記載の医薬組成物、

(11) アルツハイマー病の予防または治療に用いられる、(8)に記載の医薬組成物、

(12) (1)に記載のポリペプチドに結合する抗体、

(13) 配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含む、(1)に記載のポリペプチドをコードするDNAの検出または操作に用いられるDNA、

(14) (1)に記載のポリペプチドに結合する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 該ポリペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 該ポリペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、

(c) 該ポリペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法、
に関する。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明は、アルツハイマー病に関連する細胞死から神経細胞を保護するポリペプチドを提供する。本発明者が単離した、Humanin ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号：4に、該ポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームのcDNA配列を配列番号：3に示す。Humanin は、ADに関連する神経細胞死をアンタゴナイズする活性を有しており、約10 μ Mの濃度で飽和活性を示す。また、Humanin のアミノ酸置換体である HNG (S14G) (配列番号：6) は、Humanin に比べ 100~1000倍高いアンタゴナイズ効果を示した。本発明のポリペプチドには、Humanin および HNG が含まれる。

【0009】

また、本発明により、Humanin のC末に FLAG タグ (DYKDDDDK) を付加しても、神経保護作用に影響を与えないことが示された (実施例 3)。さらに、Humanin のC末 4アミノ酸 (KRRA) を他のアミノ酸に置換しても、元々の Humanin と同等の神経保護作用を有していた (実施例 5)。これらの事実は、Humanin または HNG のアミノ酸配列に変異を導入することによって、Humanin または HNG と同等またはそれ以上の神経保護作用を有するポリペプチドを作製できることを証明している。従って本発明のポリペプチドには、Humanin (配列番号: 4) または HNG (配列番号: 6) のアミノ酸配列において、1 または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、Humanin または HNG と機能的に同等なポリペプチドが含まれる。「Humanin または HNG と機能的に同等」とは、対象となるポリペプチドがADに関連する神経細胞死を抑制する活性を有していることを言う。ADに関連する神経細胞死は、株化神経細胞 (例えば F11 細胞) や初代神経培養 (例えばラット脳皮質初代培養) における APP、PS-1、または PS-2 の変異体 (例えば V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、および N141I PS-2) の発現により引き起こされる他、初代神経培養への A β (例えば A β 1-43) の添加によっても引き起こされる。本発明のポリペプチドには、これらのADに関連する神経細胞死の少なくともいずれかを抑制する活性を有しているものが含まれる。細胞死の抑制は、完全な抑制ではなくても、有意に抑制されればよい。神経細胞死の抑制活性は、実施例に記載された方法または他に記載の方法 (例えば文献「国際出願番号 PCT/JP99/04771」参照) に従って検定することができる。

【0010】

アミノ酸変異を有するポリペプチドは、公知のペプチド合成技術によって合成ポリペプチドとして製造することができる (日本生化学会編, 新生化学実験講座タンパク質VI, pp.3-74, 東京化学同人, 1992年)。ペプチドの合成法は、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。また、合成DNAの作製や部位特異的変異導入法などにより Humanin cDNA (配列番号: 3) に変異を導入し、これを宿主細胞で発現させて、任意のアミノ酸変異を有するポリペプチドを調製することも可能である。改変されるアミノ酸の数や位置は、得られるポリペプチドが

Humanin または HNG と機能的に同等である限り制限はない。

【0011】

また、本発明のポリペプチドには、その塩も含まれる。このような塩は酸または塩基から誘導される。具体的には、例えば無機酸との塩（例えば、塩酸塩、リン酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩など）、有機酸との塩（例えば、酢酸塩、乳酸塩、ギ酸塩、酪酸塩、グリコール酸塩、プロピオン酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、リンゴ酸塩、シュウ酸塩、安息香酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩など）、あるいは塩基との塩（例えば、アンモニウム塩、ナトリウム塩やカリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩およびマグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、有機塩基との塩、およびアルギニンやリジンなどのアミノ酸との塩）が挙げられる。

【0012】

また、本発明のポリペプチドには、その誘導体が含まれる。ここで「誘導体」とは、本発明のポリペプチドの官能基を既知の方法により修飾、付加、変異、置換、または削除などにより改変された形態を持つ分子を意味する。このような官能基の改変は、例えば、ポリペプチドに存在する官能基の保護、ポリペプチドの安定性または組織移行性の制御、あるいはポリペプチドの活性の制御等を目的として行われうる。例えば、本発明のポリペプチドには、そのN末端、C末端及びポリペプチドを構成するアミノ酸の側鎖の官能基のいずれかが保護基等の他の置換基によって修飾されているものが含まれる。置換基としては、例えば各種のアルキル基、アシル基、アミド体、リン酸基、アミノ基、カルボキシル基、エステル基など挙げられるがこれらに制限されない。

また、本発明のポリペプチドには、ポリペプチド同士を結合させたダイマーなどの重合体、分枝状分子、環化分子が含まれる。また、ポリペプチドは担体に結合していてもよい。

【0013】

本発明のポリペプチドを構成するアミノ酸は、L体および／またはD体であることができる。D体のアミノ酸の使用は、ペプチダーゼによる分解を低下させるために有用である。また、アミノ酸は天然のアミノ酸に限定されず、非天然のアミ

ノ酸でもよい。例えば、ホモセリン、 β -ヒドロキシバリン、O-4-ヒドロキシフェニルチロシン、 α -t-ブチルグリシン、2-アミノ酪酸、 α -シクロヘキシルグリシン、 α -フェニルグリシンなどをあげることができる。また、ポリペプチドのペプチド結合は、適宜ペプチド結合以外の共有結合に置換することが考えられる。非ペプチド結合への置換により、ペプチダーゼによる感受性を下げ、薬効の持続性の向上や投与ルートを選択の幅を広げることができる。非ペプチド結合の例としては、イミノ結合、エステル結合、ヒドラジン結合、セミカルバジド結合、およびアゾ結合などが挙げられるが、これらに制限されない。

また、本発明のポリペプチドの構造を模倣する化合物を設計することも考えられる。例えば、本発明のポリペプチドの構造に関する物理的および化学的性質を、活性部位修飾手法、NMR、X線結晶解析を含む公知の手法によって解析し、これを基にポリペプチドの神経保護作用に重要な物理的および化学的機能のマッピングを作成する。この機能を模倣した分子を設計し合成する。また、本発明のポリペプチドは、その活性の高さから受容体に結合すると考えられるが、同受容体に結合する化合物を設計することも考えられる。このように誘導された分子が神経保護作用を有するか否かは、実施例に記載の方法に従ってアッセイすることができる。

【0014】

本発明は、また、本発明のポリペプチドをコードするDNAを提供する。本発明のDNAの由来は特に制限されず、合成DNA、ゲノムDNA、cDNAなどが含まれる。本発明のDNAには、配列番号：3で示されるHumaninをコードするcDNAが含まれる。また、配列番号：4または配列番号：6に記載のアミノ酸をコードする任意の縮重に基づく塩基配列を有するDNAが含まれる。

本発明のDNAは、ベクターに挿入して本発明のポリペプチドの生産に利用することができる他、後述するように遺伝子治療目的に利用することができる。

本発明のポリペプチドの産生のために用いられる宿主-ベクター系としては、バキュロウイルス-Sf細胞系 (Okamoto et al., J. Biol. Chem. 270: 4205-4208, 1995)、pcDNA-CHO細胞系 (Takahashi et al., J. Biol. Chem. 270: 19041-19045, 1995)、および CMVプロモータープラスミド-COS細胞系 (Yamatsuji et

al., EMBO J. 15: 498-509, 1996) などが挙げられるが、これらに制限されない。

【0015】

本発明のポリペプチドは、宿主細胞から分泌させうる。実施例で示されるように、Humanin および HNG 等は、発現させた細胞から細胞外に分泌され、分泌されたポリペプチドは神経細胞死をアンタゴナイズする活性を示した。細胞外に分泌させた場合には、本発明のポリペプチドは宿主細胞の培養上清から簡便に回収することが可能である。

【0016】

本発明は、また、本発明のポリペプチド、または本発明のポリペプチドをコードするDNAが挿入されたベクターを有効成分とする医薬組成物を提供する。本発明のポリペプチドは、細胞に外から加えることにより、または細胞内で発現させることにより、神経変性を保護することができる。従って、本発明のポリペプチドは、特に神経変性を伴う疾患に対する医薬組成物として有用である。

【0017】

実施例に示されるように、化学合成された Humanin (HN) ポリペプチドは、細胞外液の濃度が約10nM以上で神経細胞死を抑制する活性を示し、1~10 μ Mの濃度で最大の抑制活性を示した。また、HNG ポリペプチドは、約10nMまたはそれより低い濃度で最大の抑制活性を示した。この神経保護作用は、これらのポリペプチドをコードするDNAを細胞へ導入して発現させることによってももたらされた。従って、本発明のポリペプチドを発現するベクターを医薬として用いて、遺伝子治療などを行うことも可能であると考えられる。ベクターの投与方法は、in vivo であっても ex vivo であってもよい。遺伝子治療に用いるためのベクター系としては、アデノウイルスベクター、AAV (アデノ随伴ウイルス) ベクター、ヘルペスウイルスベクター (いずれも Robbins and Ghivizzani, Pharmacol. Ther. 80: 35-47, 1998)、レトロウイルスベクター (Engel and Kohn, Front. Biosci. 4: e26-33, 1999)、レンチウイルスベクター (Lundstrom, K., 1999, J. R. ecept. Signal. Transduct. Res. 19: 673-686) などを用いることが考えられるが、これらに制限されない。

【0018】

本発明のポリペプチドまたは該ポリペプチドを発現するベクターを利用して予防や治療を行なう対象となる疾患としては、本発明のポリペプチドが疾患の治療に有効である限り、特に制限されない。好適な対象疾患としては、神経関連疾患、特にアルツハイマー病が挙げられる。これまでの研究からアルツハイマー病において神経細胞の細胞死が起こることが明らかにされている (I. Nishimoto et al., 1997, Adv. Pharmacol., 41: 337-368)。この細胞死には、APP (I. Nishimoto et al., 1998, Neurobiol. Aging., 19: S33-S38) やプレセニリン (Nishimura et al., 1999, Clin. Genet. 55: 219-225) のある種の活性化が関与していることが示唆されている。このため、本発明の医薬組成物は、アルツハイマー病における神経変性を保護する薬剤として用いられることが期待される。また、本発明の医薬組成物を用いて、アルツハイマー病以外にも、例えば脳虚血による神経細胞の細胞死に起因する疾患を予防することも可能である (T. Kirino, 1982, Brain Res., 239: 57-69)。その他、痴呆を伴うパーキンソン病 (M.H. Polymopoulos et al., 1997, Science, 276: 2045-2047)、びまん性レービー小体 (Lewy bodies) 病 (M.G. Spillantini et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 6469-6473)、ダウン症に伴う痴呆なども、治療や予防の対象となる。また、APPの類縁分子である APLP1 が、先天性ネフローゼ症候群の原因遺伝子といわれている (Lenkkeri, U. et al., 1998, Hum. Genet. 102: 192-196) ことから、ネフローゼ症候群などの腎疾患も治療や予防の対象となる。

【0019】

本発明の医薬組成物は、有効成分自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化することも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、徐放剤などと適宜組み合わせることで製剤化して投与することが考えられる。

【0020】

患者への投与は、有効成分の性質に応じて、例えば経皮的、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、腹腔内、静脈内、脊髄腔内、脳室内、または経口的に行われうる。

がそれらに限定されない。脳神経変性疾患の治療に用いる場合においては、本発明の医薬組成物は、静脈内、脊髄腔内、脳室内または硬膜内注射を含む任意の適当な経路で中枢神経系に導入するのが望ましい。投与量は、患者の年齢、体重、症状、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することが可能である。投与量、投与方法は、本発明の医薬組成物の有効成分の組織移行性、治療目的、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

【0021】

例えば、アルツハイマー病治療などにおいて、脳神経細胞の変性保護を目的とした投与を行う場合には、本発明のポリペプチドが標的とする細胞周囲において神経変性を有効に抑制する濃度となるように投与されることが好ましい。すなわち、Humaninポリペプチドまたはこれと同等の神経細胞死保護作用を有するものであれば、少なくとも 1nM 以上、好ましくは 10nM 以上、より好ましくは 100nM 以上、より好ましくは 1 μ M 以上となるように投与されるべきである。HNG またはこれと同等の神経細胞死保護作用を有するものであれば、少なくとも 1pM 以上、好ましくは 10pM 以上、より好ましくは 100pM 以上、より好ましくは 1nM 以上となるように投与されるべきである。これを達成するための投与量は、投与経路によって適宜決定することが可能である。

【0022】

また、本発明は、本発明のポリペプチドに結合する抗体を提供する。本発明の抗体には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が含まれる。ポリクローナル抗体は、例えば Humanin や HNG、またはそれらの部分ペプチドを調製し、これを抗原にウサギ、ヤギ、ヒツジなどを免疫してポリクローナル抗体を作製する。抗原ペプチドは、適宜他のタンパク質、例えばキーホールリンペットヘモシアニンやアルブミンなどのキャリア蛋白質に結合させて免疫することができる。モノクローナル抗体は、免疫したマウスやラットの脾細胞を用い、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることにより作製することができる。抗体の作製は、公知の方法に従って行うことができる (Ed. Harlow and David Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

ポリクローナル抗体は血清から、モノクローナル抗体ではハイブリドーマ培養上清またはハイブリドーマを接種した動物の腹水から硫酸分画、プロテインGセファロースカラム、抗原を固定したアフィニティーカラムなどの一般的な生化学的手法で抗体を精製することができる。

これにより調製された抗体は、本発明のポリペプチドの吸収のために用いられる他、例えば、~~本発明のポリペプチドの構造変異の検査や診断、本発明のポリペプチドの発現量の検出などに利用することが可能である。~~

【0023】

Humanin もしくは Humanin 様ペプチドの血中または神経組織を含む組織内濃度の低下が、ADを含む神経またはその他の臓器変性疾患の診断または予後判定に用いることができる可能性がある。例えば同じAD患者でも、血中のHN活性の低い人は、高い人に比べ病気の進行が急速で、予後が不良である可能性が考えられる。検査方法としては、例えば抗 Humanin 抗体を用いたRIA法により、血液または組織サンプル中の濃度を測定したり、生検材料を免疫組織染色法で検査することが考えられる。また、例えば本発明のポリペプチドの投与による治療の際に、ポリペプチドレベルをモニターすることも考えられる。

【0024】

本発明の抗体は、本発明のタンパク質に結合する限り、その抗体断片であってもよい。例えば、Fab、F(ab')₂、Fv、またはそれらの修飾物が含まれる。また、ヒト型抗体もしくはヒト抗体なども含まれる。

【0025】

本発明はまた、Humanin をコードするDNA（配列番号：3）またはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含む、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の検出または操作に用いられるDNAを提供する。「遺伝子の検出または操作」には、遺伝子発現の検出、および発現制御が含まれる。ここで「相補鎖」とは、A:T、G:Cの塩基対からなる2本鎖DNAの一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは80%、さらに好ましくは90%以上（例えば95%以上）の塩基配列上

の同一性を有すればよい。配列の同一性は、例えば文献「Altschul, S. F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410」に記載の方法に従って決定することができる。

【0026】

このようなDNAには、本発明のペプチドをコードするDNAやRNAの検出や増幅に用いるプローブやプライマー、本発明のポリペプチドの発現を抑制するためのヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイムをコードするDNA等）が含まれる。プライマーとして用いる場合、3'側の領域を相補的にして、5'側には制限酵素認識配列やタグなどを付加することができる。

【0027】

また、本発明は、本発明のポリペプチドに結合する化合物のスクリーニング方法を提供する。このようなスクリーニングは、（a）本発明のポリペプチドに被検試料を接触させる工程、（b）本発明のポリペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、および（c）本発明のポリペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法により実施することが可能である。

【0028】

本発明のポリペプチドは、スクリーニングの手法に応じて、可溶性ポリペプチドとして、また担体に結合させた形態としてスクリーニングに用いることができる。本発明のポリペプチドは標識されていてもよい。標識としては、放射性同位元素による標識、蛍光物質による標識、ビオチンやジゴキシゲニンによる標識、タグ配列の付加などが挙げられる。

【0029】

スクリーニングに用いる被検試料としては、例えば、精製タンパク質（抗体を含む）、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成ペプチドのライブラリー、細胞抽出液、細胞培養上清、合成低分子化合物のライブラリー、土壌などの天然材料、放線菌ブローなど細菌放出物質を含む溶液などが挙げられるが、これらに制限されない。被検試料は、必要に応じて適宜標識して用いられる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識などが挙げられるが、これらに制限されない。

【0030】

例えば、本発明のポリペプチドと結合するタンパク質をスクリーニングする場合は、本発明のポリペプチドを固定したアフィニティーカラムに本発明のポリペプチドと結合するタンパク質を発現していることが予想される組織または細胞の細胞抽出物をのせ、カラムに特異的に結合するタンパク質を精製することにより、~~本発明のポリペプチドに結合するタンパク質のスクリーニングを実施すること~~が可能である。

【0031】

さらに、本発明のポリペプチドと結合するタンパク質を発現していることが予想される組織若しくは細胞（例えば 脳皮質組織、または F11などの神経細胞）よりファージベクターを用いたcDNAライブラリーを作製し、アガロース上にブラークを形成させ、標識した本発明のポリペプチドを用いてウエストウエスタンブロットイング法によりスクリーニングしたり、GAL4 DNA結合領域などの DNA結合ペプチドおよびGAL4転写活性化領域などの転写活性化ペプチドを、それぞれ本発明のポリペプチドおよび被検タンパク質との融合タンパク質として発現させ、DNA結合ペプチドの結合配列を有するプロモーターの下流に連結させたレポーター遺伝子の発現を通して本発明のタンパク質と被検タンパク質との結合を検出する「twoハイブリッドシステム」等に従い実施することも可能である。

【0032】

本発明のスクリーニングにより、本発明のポリペプチドに対する受容体をクローニングすることも考えられる。この場合、被検試料は受容体を発現していることが予想される組織または細胞、例えば脳皮質組織、神経細胞株、または神経芽細胞腫や奇形腫細胞などから調製することが好ましい。神経細胞株としては、例えば F11細胞、PC12細胞(L.A. GreeneおよびA.S. Tischler, 1976, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 73: 2424-2428)、NTERA2細胞(J. SkowronskiおよびM. F. Singer, 1985, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 82: 6050-6054)、SH-SY5Y細胞(L. Odelstad et al., 1981, Brain Res., 224: 69-82)等が挙げられる。

【0033】

また、固定化した本発明のポリペプチドに、合成化合物、天然物バンク、もし

くはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーなどを作用させ、結合する分子をスクリーニングすることも考えられる。また、表面プラズモン共鳴現象を利用した結合の検出によるスクリーニングも可能である（例えば ビアコア(BIAcore社製)など）。これらのスクリーニングは、コンビナトリアルケミストリー技術を用いたハイスループットスクリーニングにより行うことも可能である。

本発明のスクリーニングにより得られた本発明のポリペプチドに結合する化合物は、本発明のポリペプチドの活性を調節する化合物の候補となり、アルツハイマー病の予防や治療への応用が考えられる。

【0034】

【実施例】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって何ら制限されるものではない。本実施例に記載された実験方法を以下に示す。

V642I APP cDNA は以前記載されている (Yamatsuji, T. et al. (1996) Science 272, 1349-1352)。PS-1 cDNA の M146L変異体および PS-2 の N141I変異体は、それぞれ Peter St. George-Hyslop博士 (Sherrington, R. et al. (1995) Nature 375, 754-760)、および Luciano D'Adamo博士 (Wolozin, B. et al. (1996) Science 274, 1710-1713) より寄贈された。本実施例で用いた全てのFAD遺伝子は pcDNA ベクター (Funk, C.D. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87: 5638-5642) にコードされている。SOD1 cDNA の FALS関連変異体 (A4T、G85R、G93A) (Takahashi, H. et al. (1994) Acta Neuropathol. 88, 185-8)、および pDN-E/G5H-Q79 は、それぞれ Shoji Tsuji博士 (Niigata University School of Medicine, Niigata, Japan)、および Akira Kakizuka博士 (Osaka Biomedical Research Center, Osaka, Japan) より寄贈された。Humanin をコードするプラスミド pHN は、Humanin DNA を pFLAG-CMV-5aベクター (pFLAG) (Eastman Kodak) のポリクローニングサイトに挿入して構築した。簡単には、pFLAG-CMV-5aプラスミドを Ec RI および KpnI で切断し、Humaninをコードするセンスプライマー (5'-AATTCACCATGGCTCCACGAGGGTTCAGCTGTCTCTTACTTTTAACCACTGAAATTGACCTGCCCCGTGAAGAGGCGGGCAGGTAC-3' / 配列番号: 1) とアンチセンスプラ

イマー (5'-CTGCCCCGCTCTTCACGGGCAGGTCAATTTCACTGGTTAAAAGTAAGAGACAGCTGAACCC TCGTGGAGCCATGGTG-3' / 配列番号: 2) をライゲーションした。このプラスミドは、FLAGタグ (DYKDDDDK) がC末端に融合した Humanin を発現する。変異HNをコードする pFLAGプラスミド (pHNGおよびpHNA) は、pHNから Quick Change Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて構築した。配列は、直接塩基配列決定法により確認した。合成 HN ポリペプチド (sHN) および構造改変した合成ポリペプチドは、Peptide Inc. で合成し、95%以上に精製したものをを用いた。抗FLAG抗体は Eastman Kodak (M2モノクローナル抗体, Cat. #IB13010) から購入した。Aβ1-43 は BACHEM (Cat. #H-1586) より購入した。他の試薬は全て商業的に入手可能なものをを用いた。

【0035】

以前記載された F11細胞 (Platika, D. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 3499-3503) は、18%ウシ胎児血清(FBS)および抗生物質を含む HamF-12 培地で培養した。6 ウェルプレート上に 7×10^4 /ウェルのF11細胞を播き、18% FBSを含む HamF-12 培地で 12~16時間培養した後、FAD遺伝子をコードするプラスミドを、HNをコードするプラスミドと共に、リポフェクションにより血清の非存在下3時間トランスフェクトし (FAD cDNA 発現プラスミド $1 \mu\text{g}$ 、HN cDNA 発現プラスミド $1 \mu\text{g}$ 、LipofectAMINE $4 \mu\text{l}$ 、Plus試薬 $8 \mu\text{l}$)、18% FBSを含む HamF-12 培地で2時間培養した。その後培地を 10% FBSを含む HamF-12 培地に交換し、さらに67時間培養した。トランスフェクションから72時間後、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。合成 HN ポリペプチドを用いた実験では、F11細胞 (6 ウェルプレート上で 7×10^4 /ウェル) に血清非存在下で上記と同様に FAD遺伝子を3時間トランスフェクトし、18% FBSを含む HamF-12 培地で2時間培養した後、様々な濃度の HN ポリペプチドと共に 10% FBSを含む HamF-12 培地で 67時間培養し、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。SOD1のFALS関連変異体 cDNA も同様にトランスフェクトし、その神経毒性作用の試験を行った。

【0036】

pHNをトランスフェクトした F11細胞の培養上清 (CM/F11-pHN) を得るため、F

11細胞に pHN をリポフェクションにて血清非存在下で3時間トランスフェクトし (pHN 1 μ g、LipofectAMINE 2 μ l、Plus試薬 4 μ l)、18% FBSを含む HamF-12 培地で2時間培養した。その後培地を 10% FBSを含む HamF-12 培地に交換し、さらに67時間培養した。この培養培地を1回凍結融解して CM/F11-pHN とした。CM/F11-pHN、CM/F11-pHNG、および CM/F11-pHNA のイムノブロット解析では、凍結融解しない培養培地にプロテアーゼインヒビターカクテル (Boehringer Mannheim, Cat. #1697498; 2mlの水に1錠を溶かし、試料の 1/25 容を添加した) を加えた。Tris/Tricineゲル電気泳動は、以前記載されたように行った (Schagger, H. and von Jagow, G. (1987) Analytical Biochemistry 166, 168-179)。

【0037】

F11/EcR/V642I 細胞は、エクダイソン誘導型 V642I APP 発現プラスミドを用いて樹立した。まず、共発現ベクター pVgRXR (Invitrogen) を F11細胞に導入し、それに続くZeocin選択により、エクダイソン受容体 EcR とレチノイドX受容体 RXR の両方を安定に過剰発現する F11細胞 (F11/EcR細胞) を樹立した。多コピーのエクダイソン応答配列を有する pIND ベクター (Invitrogen) に V642I APP cDNA を挿入し、F11/EcR細胞にトランスフェクトした後、G418選択を行った。限界希釈により、F11/EcR/V642I 細胞をクローニングした。F11/EcR/V642I 細胞は、18% FBSと抗生物質を含む HamF-12 培地で培養した。エクダイソン処理の前に、細胞を 10% FBS存在下で 24 時間培養した。その後、10% FBS存在下で 48~72 時間、細胞をエクダイソンで処理した (40 μ M Ponasterone; Invitrogen Cat. #H101-01)。エクダイソン処理に応答して、各F11/EcR/V642I 細胞で細胞死が起こり、全細胞中の細胞死の比率は処理後 72 時間で 60~70%、処理後 96 時間で80~90%に達した。F11/EcR/V642I 細胞の更に詳細な解析は、別途記載されている (国際出願番号 PCT/JP99/04771参照)。

【0038】

エクダイソンを用いた F11/EcR細胞の実験では、F11/EcR細胞を6ウェルプレートに 7×10^4 /ウェルで播き、18% FBSを含む HamF-12 培地で 12~16 時間培養し、エクダイソン誘導型プラスミド 1 μ gを単独で、または HNをコードするプラスミド 1 μ g と共に、血清非存在下で上記と同様に3時間トランスフェクトし

た。18% FBSを含む HamF-12 培地で 12~16 時間培養した後、細胞を10% FBSを含む HamF-12 培地で2時間培養し、エクダイソン (Ponasterone) を培地に添加した (終濃度 $40 \mu\text{M}$)。エクダイソンで処理後72時間での細胞死を測定した。合成 HN ポリペプチドを用いた実験では、細胞に FAD遺伝子を血清非存在下で3時間同様にトランスフェクトし、18% FBSを含む HamF-12 培地で 12~16 時間培養し、様々な濃度の HN ポリペプチドと 10% FBSを含む HamF-12 培地で2時間培養し、 $40 \mu\text{M}$ の Ponasterone を培地に添加した。エクダイソンで処理後72時間での細胞死を、トリパンブルー排除アッセイにより測定した。HD/SCA関連 Q79 c DNA も同様にトランスフェクトし、その神経毒性作用の試験を行った。

【0039】

マウス皮質神経の初代培養は、ポリ-D-リジンコートした 24ウェルプレート (Sumitomo Bakelite) で以前記載されたように行った (Eksioglu, Y. Z. et al. (1994) Brain Res. 644, 282-90)。調製した神経 (1.25×10^5 /ウェル, $250 \mu\text{l}$ 培地/ウェル) は、 10nM または $10 \mu\text{M}$ の sHN ポリペプチド存在下または非存在下で 16 時間ブレインキュベートを行い、同じ濃度の sHNポリペプチドの存在下または非存在下で、 $25 \mu\text{M}$ の $A\beta 1-43$ で 24~72 時間処理を行った。初代培養神経は、培地交換に伴う一過的な乾燥でも傷害を受けるため、 $A\beta 1-43$ による細胞の処理は次のように行った。まず、古い培地の半量 ($125 \mu\text{l}$) を捨てた。そして、 $50 \mu\text{M}$ の $A\beta 1-43$ と先に示した量の sHN を含む予め温めておいた新鮮な培地 $125 \mu\text{l}$ を培養に加えた。

【0040】

トリパンブルー排除アッセイは、次のようにして行った。プレウォッシュなしで細胞を血清不含の培地に穏やかにピペッティングして懸濁した。 $200 \mu\text{l}$ の細胞懸濁液に $50 \mu\text{l}$ の 0.4%トリパンブルー溶液 (Sigma, Cat. #T-8154) を加え (終濃度 0.08%)、室温で混合した。トリパンブルー溶液を加えてから3分以内に、染色された細胞を計数した。これを基に細胞死の比率を決定した [100-細胞生存率(%)]。LDHアッセイは、神経を培養した培地 $6 \mu\text{l}$ をサンプリングして、キット (LDH-Cytotoxic Test; Wako Pure Chemical Industries, Cat. #299-50601) を用いて行った。カルセイン染色は、以前記載されたようにして行った (Bozy

czko-Coyne, D. et al. (1993) Journal of Neuroscience Methods 50, 205-216) 。簡単には、6 μ M の Calcein-AM [3',6'-Di-(O-acetyl)-2',7'-bis[N,N-bis(carboxymethyl)aminomethyl]fluorescein, tetraacetoxymethyl ester; Dojindo, Cat. #349-07201] を神経に添加し、Calcein-AM 処理後 30 分以上経過してから蛍光顕微鏡により蛍光 (ex=490nm, em=515nm) を測定した。

ここに記載した実験は全て、少なくとも 3 回、独立してトランスフェクションまたは処理を繰り返したものである。統計解析では Student の t 検定を行った。

【 0 0 4 1 】

〔実施例 1〕 Humanin の同定

F11細胞は、E17.5のラット初代培養神経とマウス神経芽細胞腫 NTG18 を細胞融合させて樹立された、初代培養神経の不老化細胞モデルである (Platika, D. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 3499-3503) 。分化刺激がなければ、この細胞は活動電位の生成などの初代培養神経に典型的な特徴を保持している (Platika, D. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 3499-3503) 。本発明者は、3 種の FAD 原因遺伝子である V642I/F/G APP をコードする cDNA を F11細胞にトランスフェクトすることにより、APP の V642 変異体の一過的な発現が細胞死を引き起こすことを見出した (Yamatsuji, T. et al. (1996) Science 272, 1349-1352) 。そこで本発明者は、最近開発されたエクダイソン誘導系 (No, D. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 3346-51) を用いて、V642I APP を誘導できる F11 クローンの構築を行った。まず、エクダイソン受容体と RXR の両者を過剰発現する F11 クローン (F11/EcR) を樹立し、この細胞に、エクダイソン応答配列の制御下に置かれた HSV プロモーターにより発現される V642I APP cDNA をコードする pIND-V642I APP を安定にトランスフェクションすることにより、V642I APP の発現を誘導することができる F11 細胞を樹立した。このようにして樹立されたクローン F11/EcR/V642I 細胞は、そのままでは V642I APP をほとんど発現しないが、エクダイソン処理により V642I APP を過剰発現することが確かめられた。そしてエクダイソン処理に応答して、各 F11/EcR/V642I 細胞で細胞死が誘導され、全 F11/EcR/V642I 細胞中の細胞死

の比率は処理後 72 時間で 60~70%、処理後 96 時間で80~90%に達した。

【0042】

これらの細胞を用いて、D'Adamio ら (D'Adamio, L. et al. (1997) Semin. Immunol. 9, 17-23) により開発された方法に基本的に従いながら、それに修正を加えた「デストラップスクリーニング」を行った。本発明者はまず、F11/EcR/V642I 細胞に哺乳動物発現 cDNA ライブラリー (cDNAはアルツハイマー病患者の脳試料から調製し、ライブラリーは、エロンゲーションファクタープロモーターを持つ哺乳動物細胞発現ベクター pEF-BOS を用いて構築した) (Mizushima and Nagata, 1990, Nucleic Acids Res. 18: 5322) をトランスフェクトし、この細胞をエクダイソンで 72 時間処理し、生き残った細胞からプラスミドを回収した。この操作を 3 回繰り返し、最終的に約250クローンのプラスミドを得た。各プラスミドを用いたドットプロットハイブリダイゼーションにより、これらのクローンは互いにクロスハイブリダイズする 36 のグループに分類された。最も大きいグループは 28 のクローンからなっていた。本発明者は、このグループの cDNA に着目した。これらのクローンのシーケンスを行った結果、このグループに属するクローンは総合すると、5' 配列は Wnt-13 の非コード領域と相同性があり、3' 配列は ミトコンドリア 16S リボソーム RNA と相同性があり、C末端にポリA 領域を持つ融合配列からなるcDNAをコードしていた (図1)。各クローンの配列を決定したのち、各クローンのコトランスフェクションが、V642I APP cDNA をトランスフェクトした F11 細胞の細胞死を有意に抑制することができるかについてアッセイを行った。細胞死抑制活性を示した各々の配列を比較した結果、V642I APPにより誘導される細胞死をレスキューする活性は、新規な24アミノ酸のポリペプチド「MAPRGFSCLLLLTSEIDLVPVKRRA」(配列番号：4) をコードする 75bp のオープンリーディングフレーム (ORF) (5'-ATGGCTCCACGAGGGTTCAGCTGTCTCTACTTTTAACCAAGTGAATTGACCTGCCCGTGAAGAGGCGGGCATGA-3' / 配列番号：3) によりコードされていることが判明した。本発明者は、この分子を Humanin (HN) と名付けた。

【0043】

〔実施例 2〕 AD遺伝子により誘導される細胞死における各クローンの抑制効

果

図2～4は、このグループに属する各クローンをコトランスフェクトしたときの効果を示す。F11/EcR 細胞 (EcRとRXRとを安定に発現する F11 クローンで、エクダイソンにより pINDプラスミドによりコードされる遺伝子の発現が誘導される) にV642I APP をコードする pIND を一過的にトランスフェクトしたところ、~~エクダイソンの非存在下 (V642I APP 非発現条件) では、72時間後に約 20%~~の細胞が細胞死を起こしたのに対し、エクダイソンの存在下 (V642I APP 発現条件) では、有意に高い割合 (50～60%) の細胞が細胞死を起こした (図2)。F11/EcR 細胞に、V642I APP をコードするpINDに加え、DT63 をコードする pEF-BOS をトランスフェクトすると、エクダイソン存在下でも、エクダイソンにより誘導される細胞死の有意な増加は観察されなかった。これとは対照的に、pEF-BOS、または DT171 をコードする pEF-BOS を細胞にトランスフェクトした場合には、エクダイソンに応答した細胞死の有意な増加が観察された。図3は、4つの各FAD遺伝子 (~~V642I APP、NL APP、M146L PS-1、および N141I PS-2~~) により誘導される神経細胞死における DT63 の効果を示しており、各AD遺伝子をコードする pCDNA の一過的トランスフェクション系における実験結果である。V642I APP、NL APP、M146L PS-1、または N141I PS-2 cDNA をコードする pCDNA のいずれかに加え、空のpEF-BOS を F11 細胞にコトランスフェクションした場合、72時間のインキュベーションにより 50～70%の細胞が細胞死を起こした。この条件におけるトランスフェクションの効率は約60～70%であるため、各FAD遺伝子を発現する細胞の大部分が、トランスフェクト後 72 時間で細胞死を起こしたことになる。F11細胞に、各FAD遺伝子に加え、DT63をコードする pEF-BOS をトランスフェクトした場合、細胞死の増加は劇的に抑えられた。このことは、DT63 が4つのAD遺伝子により誘導される細胞死すべてに対し、高い効率でアンタゴナイズすることを示している。図4は、Humanin の全配列を含む他の DTクローンや、全配列を含まない他の DTクローン (DT29、DT44、および DT171) の効果を示す。全 Humanin 配列をコードするクローンである DT29 および DT44 では、V642I APPにより誘導される細胞死の顕著な抑制が認められたが、Humanin の ATG コドンを持たない DT171 では、V642I APPにより誘導される細胞死をアンタゴナイ

ズする作用は認められなかった。これらのデータは、Humanin がコードする ORF が、4つのすべてのAD遺伝子による細胞死から神経細胞を保護することを示している。

【0044】

【実施例3】 AD遺伝子により誘導される細胞死における Humanin の抑制効果

そこで本発明者は、Humanin cDNAを pFLAG ベクターへサブクローニング (pHN) し、V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、および N141I PS-2の各々による神経細胞死に対する pHN の効果を直接調べた。予想された通り、F11細胞に対する pHN のトランスフェクションは、毒性をほとんど示さないばかりか、各AD遺伝子による毒性を解消させた (図5)。このアンタゴナイズ活性は、pHN により各AD遺伝子の発現が抑制されたことによるものではない。なぜなら、pHN のコトランスフェクションは、CMVプロモーターにより発現する EGFP の発現を変化させなかったことから (データ省略)、コトランスフェクトされた pHN は、同じ CMV プロモーターから発現される各FAD遺伝子の発現を変化させないことが示されたからである。さらに、V642I APP、NL-APP、および N141I PS-2 のイムノブロッティングによっても、各遺伝子の発現に pHN のコトランスフェクションがほとんど影響を与えないことが確認された (データ省略)。この研究の過程で、pHNをトランスフェクトした F11 細胞の培養上清 (CM/F11-pHN) には、V642I APP により誘導される細胞死を有意に抑制する活性があることが判明した。CM/F11-pHN 存在下で V642I APP をトランスフェクトした F11細胞では、CM/F11-pHN非存在下で V642I APP をトランスフェクトした細胞に比べ、細胞死が有意に減少した (図6)。これは、pHNからの転写により生じるポリペプチドは、CM/F11-pHN中に分泌されることを示唆している。図7は、CM/F11-pHN中の HN の免疫反応性を抗FLAG抗体で調べた結果を示している。CM/F11-pHN は、HN の免疫反応性を示す 3~4 kDaの単一のバンドを含んでおり、FLAG融合HN の予想される分子量 (3837 Da) に一致していた。合成 FLAG融合HNポリペプチド (MAPRGFSCLLLLTSEIDLVPVKRR ADYKDDDDK: 下線は FLAGタグ) (配列番号: 5) を用いて半定量を行った結果、HNは CM/F11-pHN 中に 8~9 μ M の濃度で誘導されていることがわかった。これ

らの知見は、Humanin は pHN から転写され培養上清中に分泌されることを示している。

【0045】

【実施例4】 V642I APPにより誘導される細胞死における合成 Humanin ポリペプチドの抑制効果

本発明者は次に、合成 HN ポリペプチド MAPRGFSCLLLLTSEIDL~~PVK~~RRR (配列番号：4) を合成し、V642I APP により誘導される神経細胞死において、このポリペプチドを細胞外から加えた場合の作用を調べた。F11細胞に V642I APP cDNA をトランスフェクトし、10 μ M の合成 HN ポリペプチド (sHN) 存在下で培養したところ、V642I APP により誘導される細胞死は劇的に抑制された (図8)。10 nM sHN では極弱い抑制を示すのみであったが、抑制作用は添加する sHN の濃度に依存しており、1~10 μ M のレベルで完全な抑制に達した。IC₅₀ 値は約100nM であった。この用量依存曲線は、CM/F11-pHN中に分泌された HN が 10 μ Mのレベルで V642I APP により誘導される細胞死を効果的に抑制した事実と一致している。分泌された HN は次第に蓄積し、培養72時間をかけて、最終的に 10 μ M のレベルにまで達することを考慮すると、V642I APP により誘導される細胞死の CM/F11-pHN による抑制が完全にならない傾向があることを説明することができる (図6)。

【0046】

【実施例5】 V642I APPにより誘導される細胞死における Humanin ポリペプチドの構造的誘導体の抑制効果

本発明者はさらに、sHN の細胞死抑制作用が特異的な一次構造によるものであるのかを検討した。ポリペプチドとして S14G (MAPRGFSCLLLLTGEIDL~~PVK~~RRR：下線のGはSから置換されている；HNGと称す) (配列番号：6) を用いると、V642I APP により誘導される細胞死に対し、10nM以下の濃度において完全なアンタゴナイズ効果が認められ、IC₅₀ は約100pMであった。これに対して、C8A HN ポリペプチド (MAPRGFSALLLLTSEIDL~~PVK~~RRR：下線のAはCから置換された；HNAと称す) (配列番号：7) は 100 μ M までの濃度において、V642I APP により誘導される細胞死を有意に抑制することはできなかった。8位の Cys が重要であることは

、8位の Cys を介した HN のダイマー (C8-C8 HN) により得られた結果からも示唆された。C8-C8 HN のアンタゴナイズ作用のレベルは、元々の HN と HNA の中間であった。また、対照的に、HN の C 末端の KRRA を AAAA に置換した誘導体は、元々の HN ポリペプチドと同様の作用能を示した。これらの結果は、Humanin のレスキュー活性に一次構造が本質的な役割をもつと共に、特定のアミノ酸残基が決まった役割を有していることを示している。

【 0 0 4 7 】

〔実施例 6〕 AD 遺伝子により誘導される細胞死における Humanin ポリペプチドおよびその構造的誘導体の抑制効果

次に、他の AD 遺伝子、すなわち NL-APP、M146L PS-1、および N141I PS-2 により誘導される細胞死に対する合成 HNG (sHNG) および合成 HNA (sHNA) の効果を調べた。図 9 に示したように、元々の sHN はいずれの AD 遺伝子においても同様の用量-応答特性を示し、 $1\mu\text{M}$ の濃度で各 AD 遺伝子により誘導される神経細胞死を妨げた。sHNA は $100\mu\text{M}$ までの濃度において、いずれの AD 遺伝子による細胞死もアンタゴナイズしなかった。これに対し、sHNG は 10nM かそれより低い濃度で、各 FAD 遺伝子による細胞死を抑制する完全な活性を有していた。これは、Humanin の作用は S14G の置換により 100 から 1000 倍に高められることを示している。V642I APP により誘導される細胞死に対する sHNG の作用を合わせて考えると、sHNG は 10nM 以下の濃度で、4 種の異なるタイプの FAD 関連遺伝子により誘導される神経細胞死を、完全にアンタゴナイズすることができると結論される。

【 0 0 4 8 】

〔実施例 7〕 Humanin およびの構造的誘導体の発現ベクターの導入による細胞死抑制効果

合成ポリペプチドで得られたデータを確認するため、次に HNG または HNA をコードするプラスミド (それぞれ pHNG または pHNA) の細胞死抑制効果を、pHN と比較して調べた。図 10 に示したように、pHNG のコトランスフェクションは、pHN の場合と同様に、4 種すべての AD 遺伝子により誘導される細胞死を完全に抑制した。これとは対照的に、pHNA のコトランスフェクションでは、HNA ポリ

ペプチドは、pHNの場合と同様に産生され、培地中に分泌されているにも関わらず、いずれの AD 遺伝子により誘導される細胞死も抑制しなかった（図 7）。HN をコードする各プラスミドから得られたこれらのデータは、先に述べた HN ポリペプチドの構造依存性の概要を支持しているのみならず、CM/F11-pHNG（pHNG をトランスフェクトした F11 細胞の培養上清）中の HNG 濃度は 10nM を超えているはずであることを示唆している。これに一致して、イムノブロット解析では、pHNG をトランスフェクトした F11 細胞からの培養上清には HNG ポリペプチドが約 10 μ M 含まれていた（図 7）。これらのデータは、Humanin の細胞死抑制活性はその特異的なアミノ酸構造により決定されており、細胞外から添加された HN ポリペプチドによるレスキュー作用は、細胞内で発現された HN cDNA によっても再現されることを示している。

【0049】

【実施例 8】 Humanin の細胞死抑制効果の特異性

Humanin の作用の特異性を明らかにするため、次に HN cDNA または HN ポリペプチドが、他の神経変性疾患の原因遺伝子により誘導される細胞死をアンタゴナイズすることができるかを調べた。72 回の繰返しを持つポリグルタミン Q79 は、ハンチントン病 (HD) や、あるタイプの脊髄小脳性運動失調症 (spinocerebellar ataxia; SCA) の原因になっていると考えられている (Kakizuka, A. (1997) Curr. Opin. Neurol. 10, 285-90)。Q79 の発現が神経細胞の細胞死を引き起こすことが報告 (Ikeda, H. et al. (1996) Nat. Genet. 13, 196-202) されているように、Q79 の発現により F11 細胞は細胞死を起こした。pHN トランスフェクションや sHN 処理が Q79 の発現に及ぼす影響を最小にするため、本発明者はここでもう一度エクダイソン誘導系を用いた。エクダイソンにより発現が誘導される Q79 プラスミド (pDN-E/G5H-Q79) を F11/EcR 細胞にトランスフェクトし、エクダイソンの存在下または非存在下で細胞死の比率を調べた。この系において、pDN-E/G5H-Q79 を pFLAG と共に F11/EcR 細胞にトランスフェクションした場合は、エクダイソン処理に応答して細胞死の比率は顕著に増加した（図 11A）。F11/EcR 細胞に、pDN-E/G5H-Q79 を pHN、pHNG、または pHNA と共にトランスフェクトした場合でも、エクダイソン処理により、同じように高い比率の

細胞死が誘導された。これに対し、エクダイソンにより誘導される V642I APP または NL-APP の発現により引き起こされる F11/EcR 細胞の細胞死は、pHNのコトランスフェクションにより効果的に抑制された(図11B)。sHNを用いた実験においても、Q79により誘導される細胞死は抑制されなかった(図11C)。F11/EcR 細胞に pDN-E/G5H-Q79 をトランスフェクトした場合、4種のFAD遺伝子による F11/EcR 細胞の細胞死を sHN や sHNG が明確に抑制できる濃度の sHN、sHNG、または sHNA の存在下においても、非存在下における場合と同様、エクダイソンによって大幅な細胞死が引き起こされた。

【0050】

本発明者はまた、家族性筋萎縮性側索硬化症(familial amyotrophic lateral sclerosis; FALS)に関連した Cu/Zn依存性スーパーオキシドデスムターゼ(SOD1)の A4T、G85R、または G93A 変異体により誘導される神経細胞死に対する Humanin の効果を調べた。FALS関連 SOD1 変異体の発現が哺乳動物神経細胞を殺すという以前の報告(Rabizadeh, S. et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 3024-8; Ghadge, G. D. et al. (1997) J. Neurosci. 17, 8756-66)と一致して、これらすべての変異体において、それぞれの変異体を発現する cDNA を F11 細胞にトランスフェクトすることにより、有意に細胞死が引き起こされた。そして、各SOD1変異遺伝子に加え、pHNを F11 細胞にコトランスフェクトした場合でも、同様の高い細胞死が誘導された(図12A)。図12Bに示したように、100 μ M のsHN、sHNG、または sHNA のいずれによっても、各 FALS関連 SOD1 変異による細胞死の有意な抑制は認められなかった。これらのデータは、Humanin は FAD 遺伝子により触発される細胞死実行機構を無効にする細胞内機構を活性化するが、HD/SCA または FALS 遺伝子による細胞死には機能しないことを示唆しており、Humanin cDNA および Humanin ポリペプチドのアンタゴナイズ効果は、ADに関連する神経細胞死に共通かつ特異的であることを証拠付けるものである。

【0051】

[実施例9] 初代神経培養の細胞死における Humanin の抑制効果

本発明者は最後に、Humanin による、初代培養神経のADに関連する傷害から

の保護について調べた。 $A\beta$ は老人斑の主要なペプチド成分で、AD脳を病理学的に特徴付ける細胞外沈着物であり、ADの病理機構に関与していると言われている (Selkoe, D. J. (1994) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 438-47; Cummings, J. L. et al. (1998) *Neurology* 51, S2-17; discussion S65-67)。 $A\beta$ 処理は初代培養神経の細胞死を引き起こすことが報告されている (Loo, D. T. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 7951-7955)。図1-3に示すように、初代培養皮質神経を $25\mu\text{M}$ の $A\beta 1-43$ で 48~72時間処理すると、N2サプリメントの存在下または非存在下にて、軸索の異栄養変化 (dystrophic neuritic changes) を伴う広範な細胞死が引き起こされた (図1-3および1-4; N2サプリメントの非存在下の培養は図1-3a)。初代培養神経を $10\mu\text{M}$ の sHN で前処理すると、 $A\beta$ で誘導される細胞死と共に軸索の異栄養変化が劇的に抑制された。トリパンブルー排除で測定した細胞死と、細胞から放出された LDH により測定した細胞傷害は、 $A\beta 1-43$ により増加したが、 $10\mu\text{M}$ 以上の sHN 処理により、細胞の生存を示すこれらの指標はベーサルな状態で観察されたレベルに回復した。同じ条件で、 100ng/ml の NGF は $A\beta$ により誘導される神経細胞死をレスキューする効果はなかった (データ省略)。 $A\beta$ により誘導される神経細胞死のアンタゴナイズに sHN が劇的な効果をあげたのに対して、 $10\mu\text{M}$ sHN を神経に同様に処理しても、初代培養神経に対する $20\mu\text{M}$ のエトポサイド (etoposide) の毒性を防ぐことはできなかった (データ省略)。エトポサイドは抗癌剤であり、初代培養神経の細胞死を引き起こすことが報告されている (Nakajima, M. et al. (1994) *Brain Res.* 641, 350-2)。これらの知見は、Humanin は $A\beta 1-43$ により誘導される神経細胞死を、選択的な機構でレスキューするという考えを支持する。F11細胞を用いた AD 遺伝子の実験で指摘したのと同様に、 10nM sHNG は、 $A\beta 1-43$ による細胞死および軸索の異栄養変化から神経をほぼ完全に保護したが、 10nM sHN または $10\mu\text{M}$ sHNAは、 $A\beta$ の毒性に対し効果を示さなかった (形態変化を図1-5に示す)。このことは、カルセイン (Calcein) 染色アッセイによる生細胞の測定 (図1-6) およびトリパンブルー排除アッセイによる死細胞の測定 (図1-7) の両方で確かめられた。これらのデータから、Humanin はクローン化された神経細胞における場合と同様に、初代培養神経においても、抗AD因子とし

ての効果を有していることが示された。さらに、これらのデータから、Humaninの構造を特異的に認識する受容体(群)が、F11細胞と初代培養神経に共通して存在していると考えることができる。

【0052】

【発明の効果】

本発明によって、アルツハイマーに関連する神経変性をアンタゴナイズする能力を有するポリペプチド Humanin が提供された。該ポリペプチドは、4種のAD遺伝子およびA β により誘導される神経細胞の細胞死をアンタゴナイズする能力を有する初めての分子であり、クローン化された神経細胞において、V642I APP、NL-APP、PS-1変異体、およびPS-2変異体による細胞死を、そして初代培養神経において A β 1-43 による細胞死をアンタゴナイズできる。細胞外に作用し、既知のすべてのタイプのFAD遺伝子およびA β をアンタゴナイズするという広いスペクトラムを持つレスキュー因子はこれまで全く同定されていない。特に、HNG が 10nM 足らずでADに関連する神経毒性を完全にアンタゴナイズするということは、アルツハイマーに関連する神経細胞死の機構解明に有用であると同じに、臨床応用の観点からも有用である。この新規なポリペプチドである Humanin、およびこれと同等またはより高い能力を持つその構造的誘導体群は、アルツハイマー病に関連する神経細胞死を予防する医薬として、また新たなアルツハイマー病治療薬開発のためのシード化合物として有用である。

【0053】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Keio University

<120> Humanin, a novel polypeptide that protects neuronal death

<130> KUV-102

<140>

<141>

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized Humanin sense primer

<400> 1

aattcaccat ggctccacga gggttcagct gtctcttact ttaaccagt gaaattgacc 60

tgcccgtgaa gaggcgggca ggtac

85

<210> 2

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized Humanin antisense primer

<400> 2

ctgcccgct cttcacgggc aggtcaattt cactggttaa aagtaagaga cagctgaacc 60

ctcgtggagc catggtg

77

<210> 3

<211> 75

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(72)

<400> 3

atg gct cca cga ggg ttc agc tgt ctc tta ctt tta acc agt gaa att 48

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile

1

5

10

15

gac ctg ccc gtg aag agg cgg gca tga

75

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala

20

<210> 4

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile

1

5

10

15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala

20

<210> 5

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized FLAG-fused Humanin polypeptide

<400> 6

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile

1

5

10

15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

20

25

30

<210> 6

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: HNG, S14G
substitution of Humanin

<400> 6

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 7

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: HNA, C8A
substitution of Humanin

<400> 7

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Ala Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile

1

5

10

15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】

Humanin cDNA クローンにおける、V642I APPによる細胞死をアンタゴナイズする活性をコードする領域を示す図である。

DNA断片を、最も長い配列（-943から592；1番目の塩基は Humanin ORF の最初の塩基に対応し、その1塩基前は -1 である）に対して整列させた。V642I APP により誘導される F11/EcR 細胞の細胞死に対するそれらの活性を横に示す。F11/EcR 細胞に V642I APP をコードする pIND (1 μ g) と共に、1 μ gの pEF-BOS またはそれぞれのDNA断片をコードする pEF-BOS を3時間トランスフェクトし、続いてエクダイソンで72時間処理した。トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。pEF-BOS をトランスフェクトした細胞とそれぞれのDNA断片をトランスフェクトした細胞との間で、細胞死に統計的に有意な差があった場合、このDNA断片にはレスキュー活性があると判定し、"Y"で示した。"N"は有意なレスキュー活性がなかったことを示す。

【図 2】

エクダイソンにより誘導される V642I APP の発現による神経細胞死における DT63 と DT171 クローンの効果を示す図である。F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型 V642I APP プラスミドと共に、pEF-BOS、DT63、またはDT171 (DT63とD171は pEF-BOS にクローン化されている) をトランスフェクトし、Ponasterone (エクダイソン) 処理を行った。エクダイソン処理を行わない群も設定した。エクダイソン処理の 72 時間後、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。また、エクダイソン処理を行わない群も同様に測定した。図中の数値とエラーバーは、3回の独立したトランスフェクション／処理の結果の平均 \pm S.D.を表

す。DT63とDT171は図1に示されている。

【図3】

FAD遺伝子の発現により誘導される神経細胞死における DT63 クローンの効果を示す図である。F11細胞に pcDNA または V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、もしくは N141I PS-2をコードする pcDNA と共に、pEF-BOS (vec) または DT63 をコードする pEF-BOS をトランスフェクトし 72時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

【図4】

FAD遺伝子のトランスフェクションによる F11 細胞の細胞死における DT29、DT44、および DT171 クローンの効果を示す図である。図3と同様に、F11細胞に pcDNA または V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、もしくは N141I PS-2をコードする pcDNA と共に、pEF-BOS (pBOS) または DT クローンをコードする pEF-BOS をトランスフェクトし 72時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。DT29とDT44は図1に示されている。3つの実験を同時に行ったところ、ベーサルな細胞死の比率（トランスフェクションなし、pcDNA+pBOS）は共通していた。同様の実験は少なくとも3回行った。

【図5】

FAD遺伝子の発現により誘導される神経細胞死における、Humaninをコードするプラスミド pHN の効果を示す図である。F11細胞に空ベクター（pcDNA）または V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、もしくは N141I PS-2をコードする pcDNA と共に、pFLAG または HN をコードする pFLAG (pHN) をトランスフェクトし 72時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

【図6】

V642I APPにより誘導される神経細胞死における、pHN をトランスフェクトしたF11細胞からの培養上清の抑制効果を示す図である。F11細胞に pcDNA または V642I APPをコードする pcDNA を血清非存在下で3時間トランスフェクトし、18%FBSを含む HamF-12 で2時間培養した後、CM/F11-pHN または新鮮な培地（18%FBSを含む新しい HamF-12）で67時間培養した。トランスフェクション 72時間後に、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。p<0.01 は Student

t の t 検定によるのもで、"n.s." は有意差がないことを表す。

【図 7】

pHN、pHNG、または pHNA をトランスフェクトした F11 細胞の培養上清に含まれる Humain ポリペプチドの免疫反応性を示す図である。培養上清にプロテアーゼ阻害剤のカクテルを加え、Tris/Tricine ゲル電気泳動後、抗 FLAG 抗体を用いたイムノブロットを行った。右の 3 レーンは、培養上清中に含まれる HN ポリペプチドの半定量を行うために、図示した濃度の sHN-FLAG (sHN の C 末に DYKDDDDK を融合させたもの) のイムノブロットを行った結果を示す。

【図 8】

V642I APP により誘導される神経細胞死における、合成 HN (sHN) およびその構造的誘導体の効果を示す図である。F11 細胞に V642I APP をコードする pcDNA をトランスフェクトし、様々な濃度の sHN (元々の Humanin)、sHNG (S14G)、sHNA (C8A)、C8 を介した sHN のダイマー型 (C8-C8)、および C 末の KRRA を AA に置換した sHN (KRRA21/22/23/24AAAA) で処理した。トランスフェクション 72 時間後に、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。

【図 9】

他の AD 遺伝子 (M146L PS-1、N141I PS-2、または NL-APP) により誘導される神経細胞死における合成 HN およびその構造的誘導体 (sHN、sHNG、または sHNA) の効果を示す図である。図 8 と同様に、M146L PS-1、N141I PS-2、または NL-APP cDNA をトランスフェクトした F11 細胞を、様々な濃度の sHN (元々の Humanin)、sHNG (S14G)、または sHNA (C8A) で処理した。トランスフェクション 72 時間後に、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。

【図 10】

FAD 遺伝子の発現により誘導される神経細胞における pHN、pHNG、または pHNA の効果を示す図である。F11 細胞に空ベクター (pcDNA) または V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、もしくは N141I PS-2 をコードする pcDNA と共に、pFLAG または HN をコードする pFLAG (pHN、pHNG、または pHNA) をトランスフェクトし 72 時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

【図 11】

ポリグルタミンリピート Q79 により誘導される神経細胞死におけるHNおよびその構造的誘導体の効果の欠如を示す図である。

A: エクダイソンで発現誘導される Q79 により誘導される神経細胞死における、pHN、pHNG、または pHNA の効果の欠如。F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型 Q79 発現ベクターと共に、空ベクター (pFLAG)、または pHN、pHNG、もしくは pHNAをトランスフェクトし、エクダイソン存在下または非存在下で 72時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

B: エクダイソンで発現誘導される NL-APP または V642I APP により誘導される神経細胞死における、pHNのコトランスフェクションによる有意な抑制効果。Aと同じ条件で、F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型 NL-APP または V642I APP プラスミドと共に、pFLAG または pHN をトランスフェクトし、エクダイソン存在下または非存在下で 72時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

C: エクダイソンで発現誘導される Q79 により誘導される神経細胞死における、sHN、sHNG、または sHNA の効果の欠如。F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型 Q79 プラスミドをトランスフェクトし、1 μ M の sHN、sHNG、または sHNA で処理し、その後エクダイソン処理を行った。エクダイソン処理の 72 時間後、細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

【図 1 2】

FALS関連SOD1変異体により誘導される神経細胞死におけるHNおよびその構造的誘導体の効果の欠如を示す図である。

A: FALS関連SOD1変異体の発現により誘導される神経細胞死における、pHNのコトランスフェクションの効果の欠如。F11 細胞に、FALS関連変異 SOD1 (SOD1 の A4T、G85R、またはG93A 変異体) をコードする pEF-BOSと共に、空ベクター (pFLAG)、または pHN をトランスフェクトした。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

B: FALS関連SOD1変異体の発現により誘導される神経細胞死における、sHN、sHNG、または sHNA の効果の欠如。F11 細胞に、A4T、G85R、またはG93A SOD1 をコードする pEF-BOSをトランスフェクトし、100 μ M の sHN、sHNG、または sHNA

で処理した。その後、細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

【図 1 3】

$A\beta$ 1-43 により誘導される初代培養神経の細胞死における HN ポリペプチド (sHN) の効果を示す図である。初代培養皮質神経を、sHN の存在下または非存在下で $25\mu\text{M}$ の $A\beta$ 1-43 で 72 時間処理した。 $A\beta$ 1-43+ $10\mu\text{M}$ sHN”では、 $A\beta$ 1-43 処理の 16 時間前に $10\mu\text{M}$ の sHN を 1 回添加した。 $A\beta$ 1-43+ $>10\mu\text{M}$ sHN”では、 $10\mu\text{M}$ の sHN を 4 回 (1 回目: $A\beta$ 1-43 処理の 16 時間前、2 回目: $A\beta$ 1-43 処理時、3 回目: $A\beta$ 1-43 処理の 24 時間後、4 回目: $A\beta$ 1-43 処理の 48 時間後) 添加した。

$A\beta$ 処理の 72 時間後に細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。細胞傷害性を培地中への LDH の放出によりモニターした。実験は N2 サプリメントの存在下 (b) または非存在下 (a) で行った。各実験は 2 つの神経培養を用いて行い、その平均を示した。同様の実験を少なくとも 3 回行ったところ、S.E. は対応する平均値に対して 5% 未満であった。

【図 1 4】

$A\beta$ 1-43 により誘導される初代培養神経の細胞死における sHN の効果を示す位相差顕微鏡像である。初代培養皮質神経を sHN の存在下 ($>10\mu\text{M}$) (図 1 3 と同様の $10\mu\text{M}$ sHN 4 回の処理) または非存在下で $25\mu\text{M}$ の $A\beta$ 1-43 で 72 時間処理した。代表的な観察像を示した。

【図 1 5】

$A\beta$ 1-43 により誘導される初代培養神経の細胞死における sHN、sHNG、または sHNA の効果を示す位相差顕微鏡像である。代表的な観察像を示した。N2 サプリメントの存在下、初代培養皮質神経を sHN (10nM , $10\mu\text{M}$)、 10nM sHNG、または $10\mu\text{M}$ sHNA の存在下または非存在下で $25\mu\text{M}$ の $A\beta$ 1-43 で 72 時間処理した。これらの実験では、図示した最終濃度の HN ポリペプチドを $A\beta$ 1-43 処理の 16 時間前に 1 回添加した。同様の実験を少なくとも 3 回行ったが、いずれも同様の結果を得た。

【図 1 6】

$A\beta$ 1-43 により誘導される初代培養神経の細胞死における sHN、sHNG、または

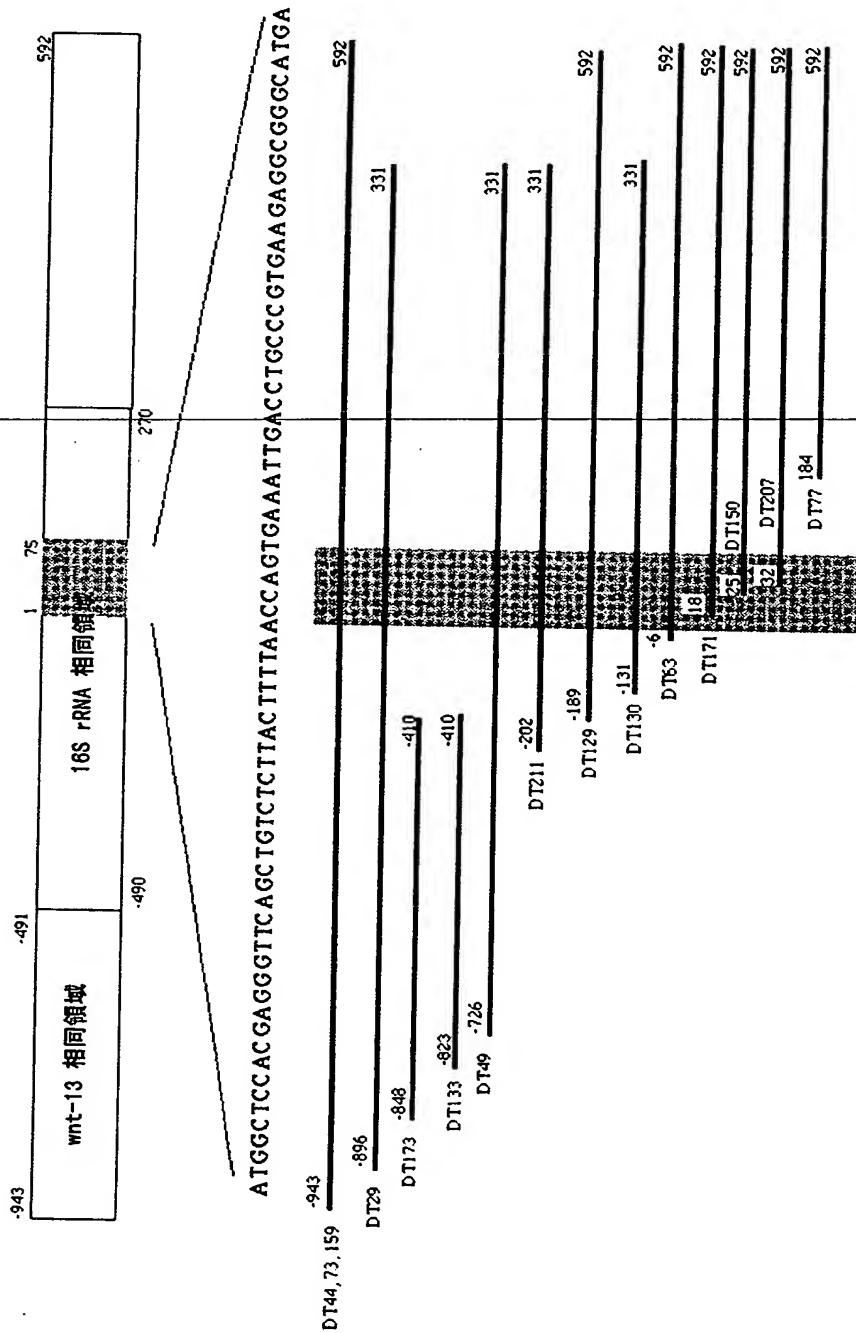
sHNA の効果を、Calcein-AM染色により調べた結果を示す蛍光顕微鏡像である。代表的な観察像を示した。N2サプリメントの存在下、初代培養皮質神経を sHN (10nM, 10 μ M)、10nM sHNG、または10 μ M sHNA の存在下または非存在下で 25 μ M のA β 1-43 で 72 時間処理した。これらの実験では、図示した最終濃度の HN ポリペプチドを A β 1-43 処理の 16 時間前に 1 回添加した。同様の実験を少なくとも 3 回行ったが、いずれも同様の結果を得た。A β 1-43 処理の 72 時間後に Calcein-AM で染色を行った。細胞質における蛍光は生細胞であることを表す。

【図 17】

A β 1-43 により誘導される初代培養神経の細胞死における sHN、sHNG、または sHNA の効果を示す図である。N2サプリメントの存在下、初代培養皮質神経を sHN (10nM, 10 μ M)、10nM sHNG、または10 μ M sHNA の存在下または非存在下で 25 μ M のA β 1-43 で 72 時間処理した。細胞死を A β 1-43 処理の 72 時間後に トリパンブルー排除アッセイにより測定した。これらの実験では、図示した最終濃度の HN ポリペプチドを A β 1-43 処理の 16 時間前に 1 回添加した。同様の実験を少なくとも 3 回行ったが、いずれも同様の結果を得た。

【書類名】 図面

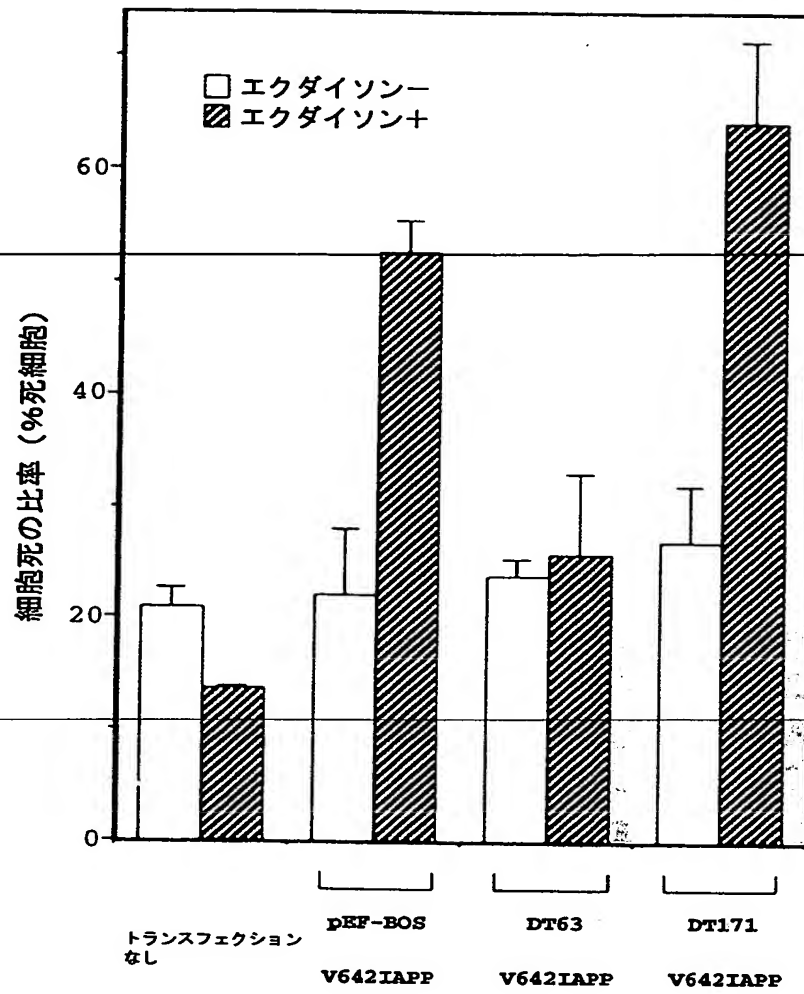
【図 1】



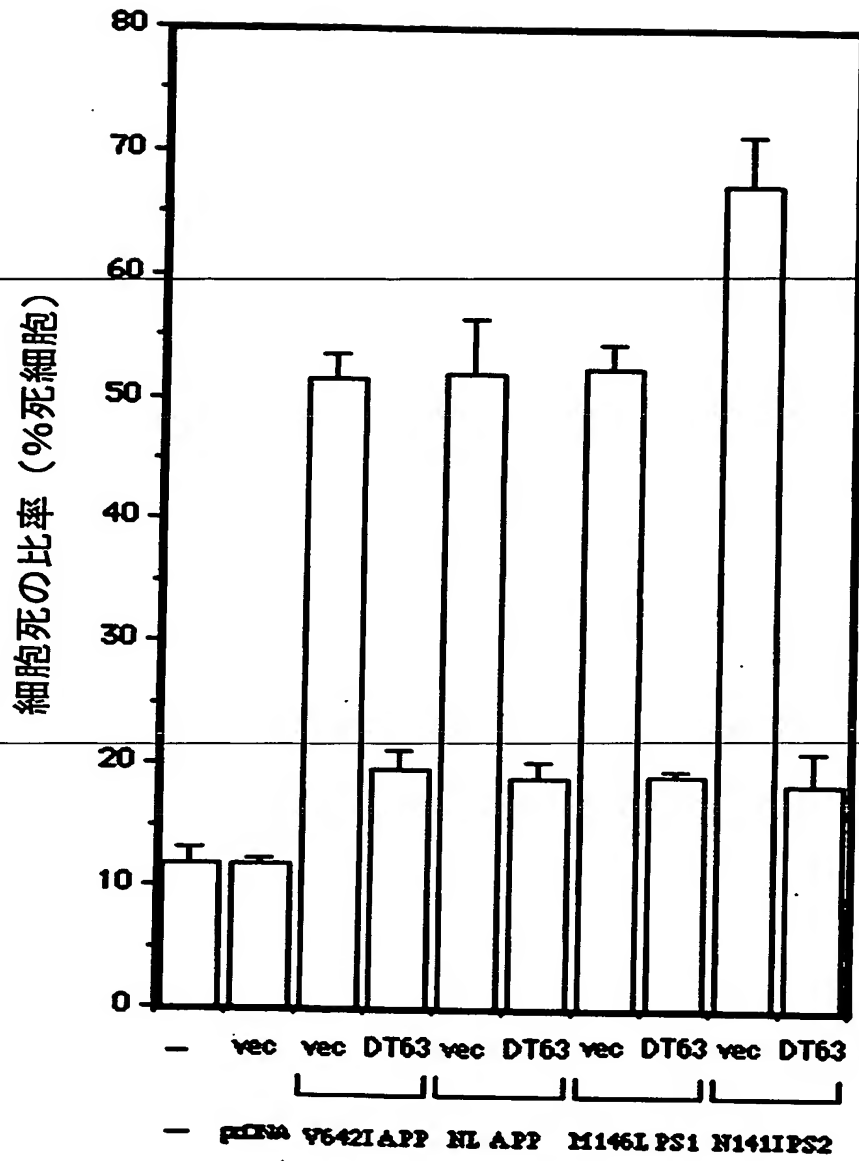
レスキュー活性

Y Y N N Y Y Y Y Y N N N N

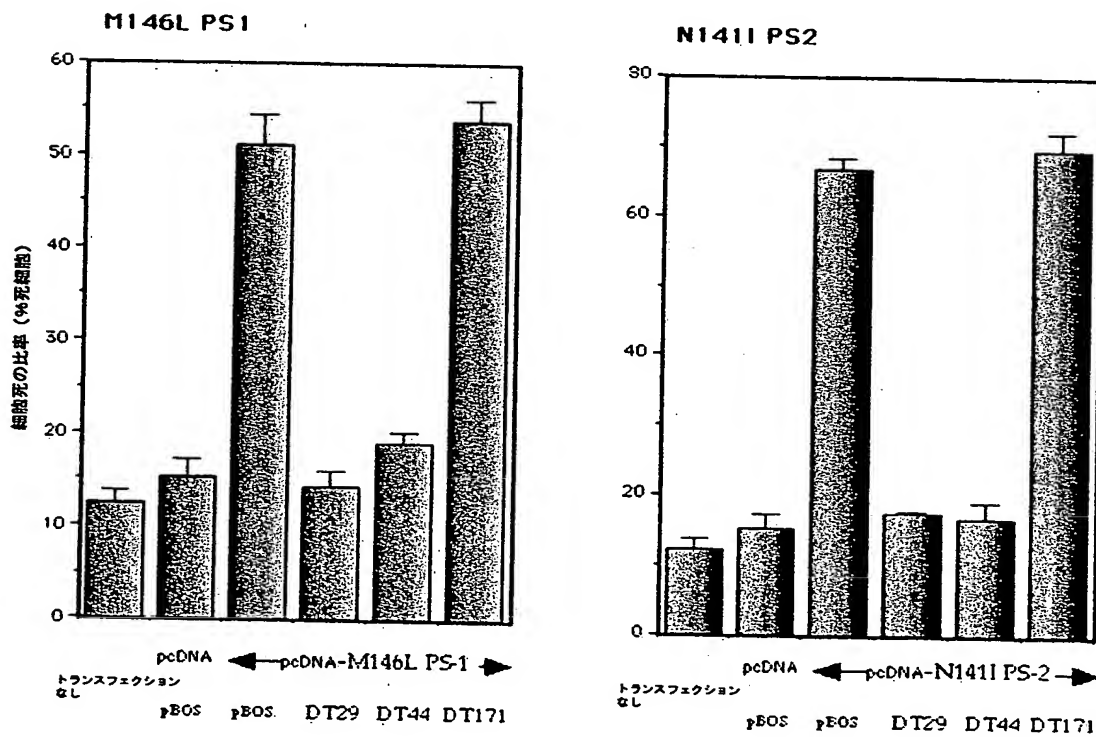
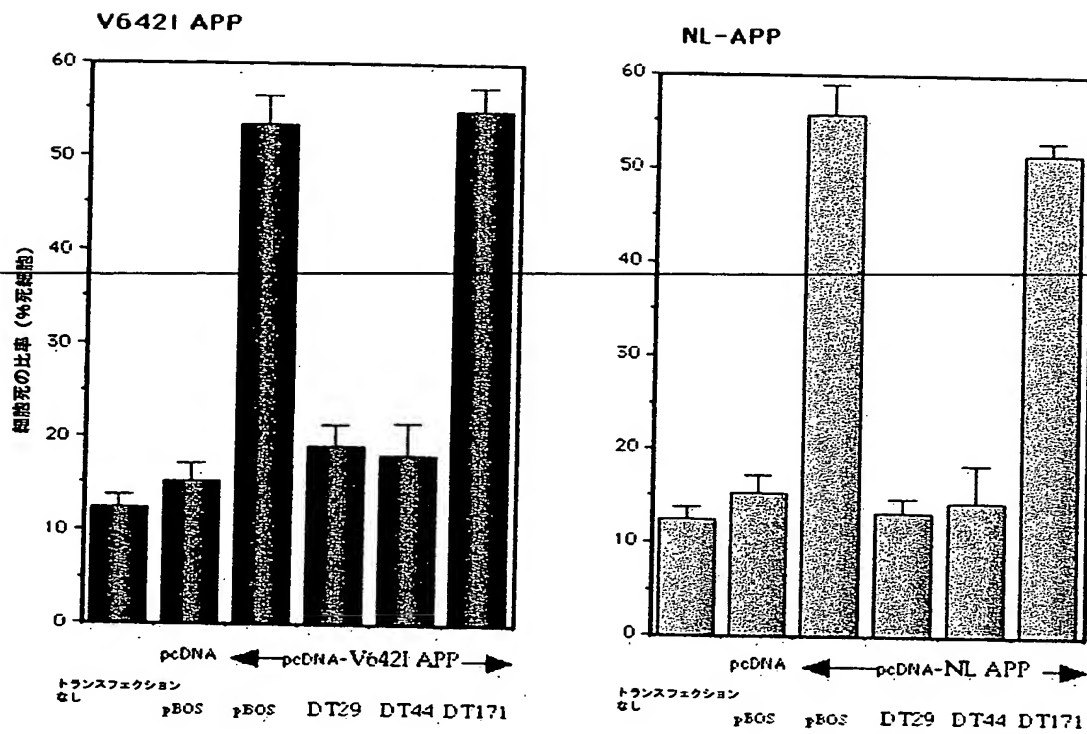
【図 2】



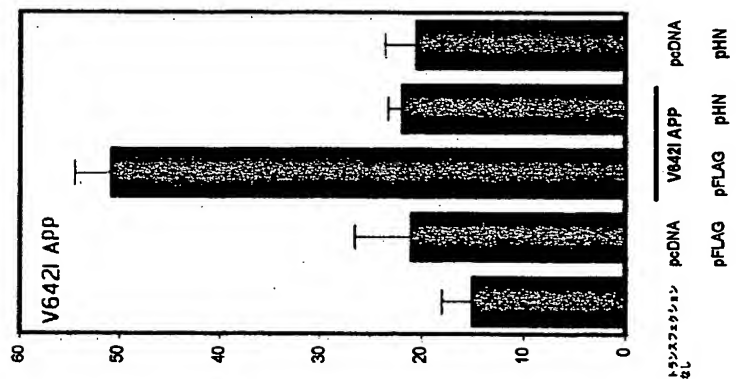
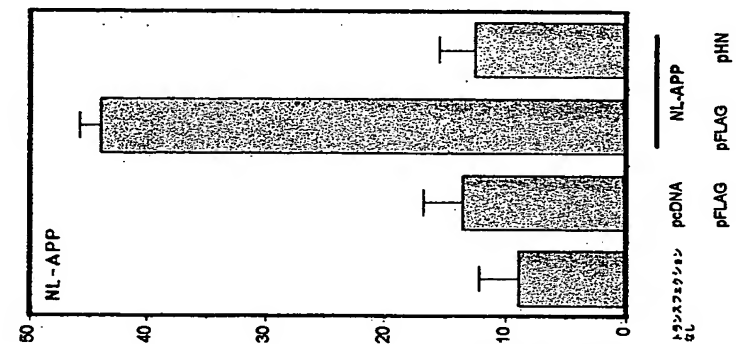
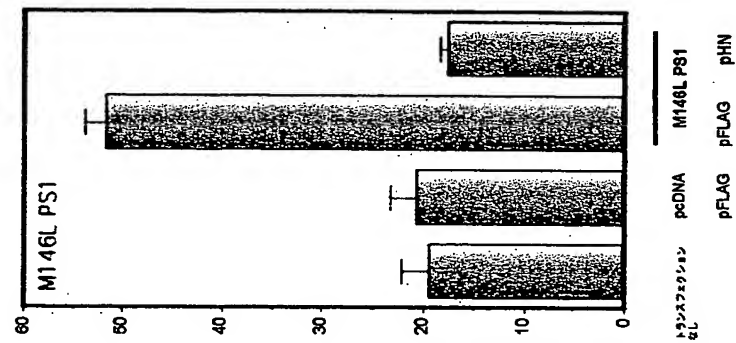
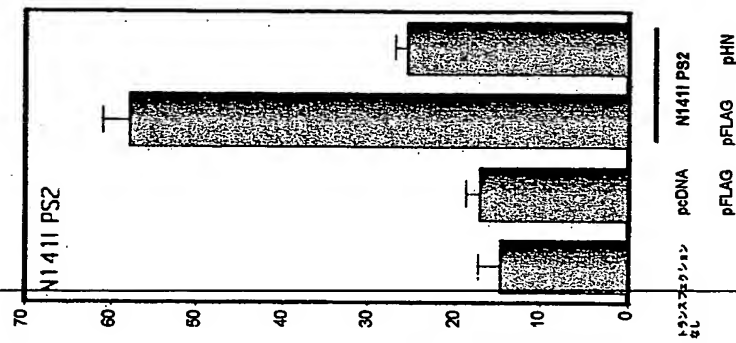
【図 3】



【図 4】

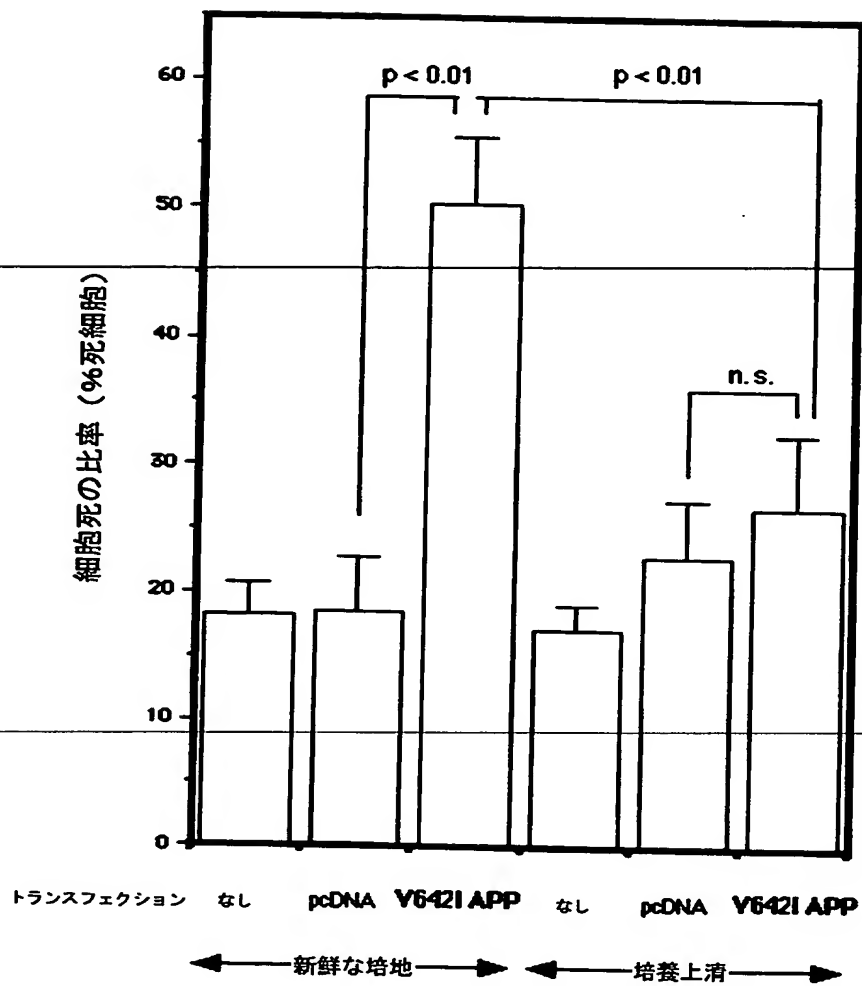


【図 5】

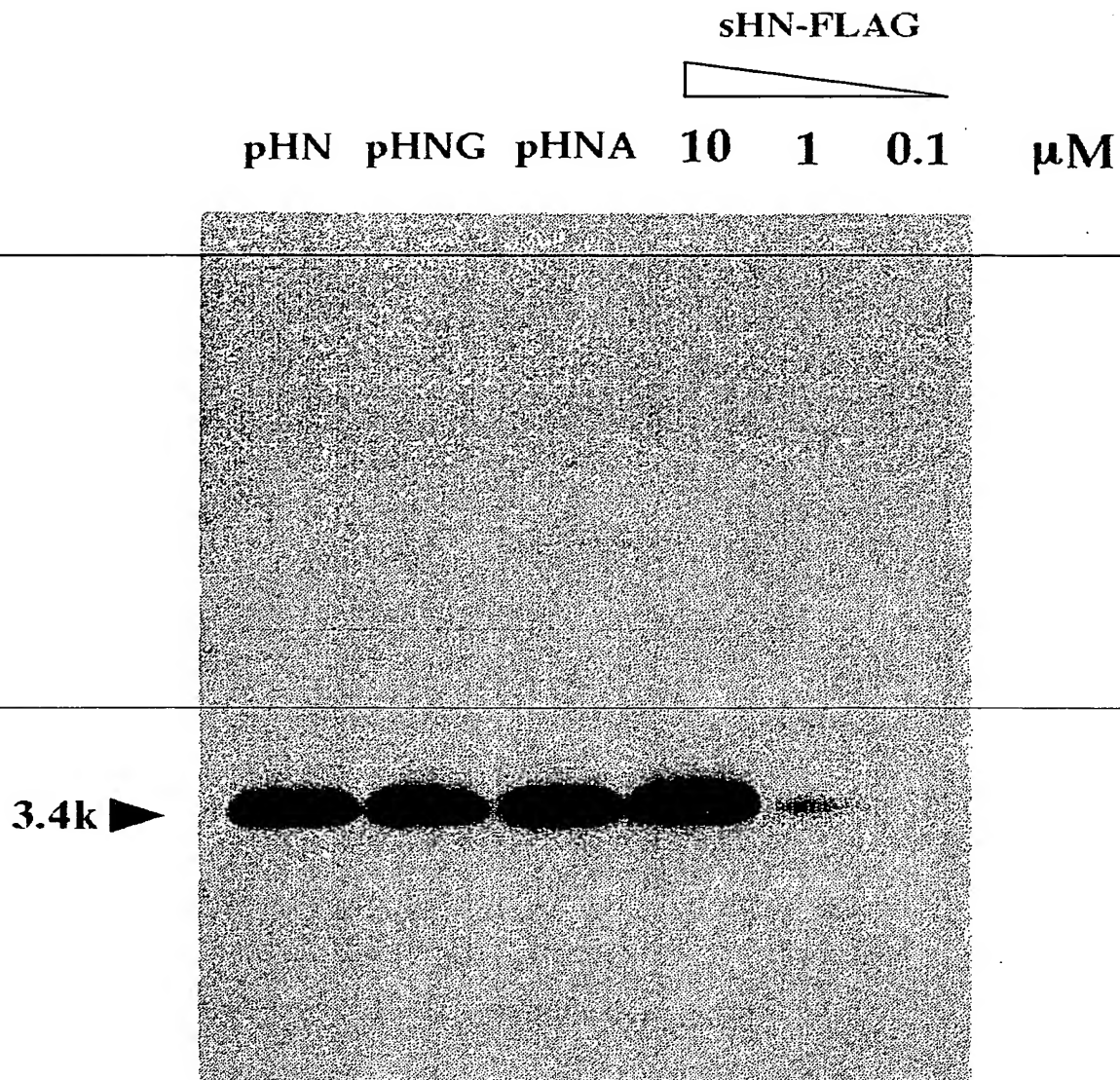


細胞死の比率 (%死細胞)

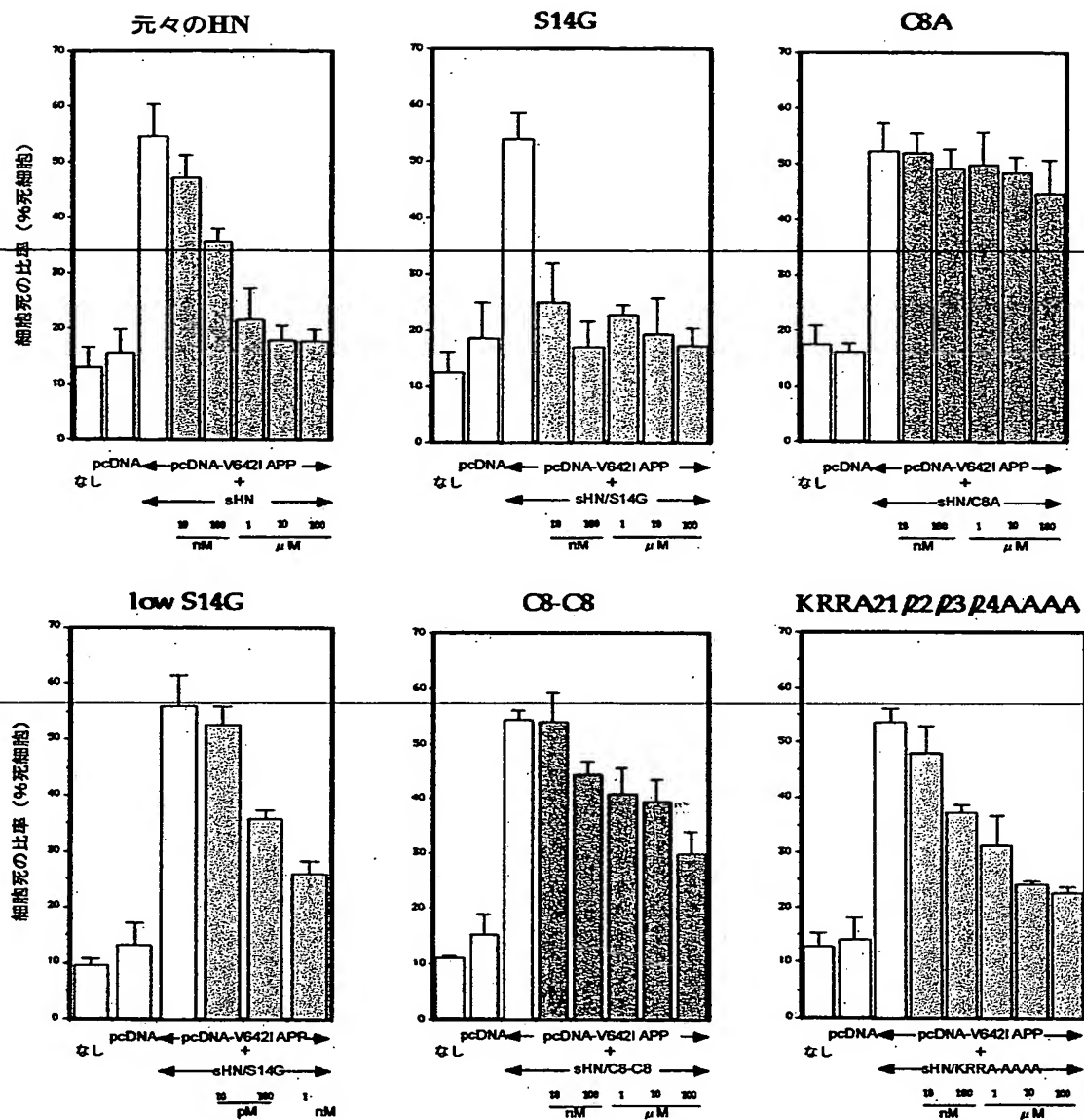
【図 6】



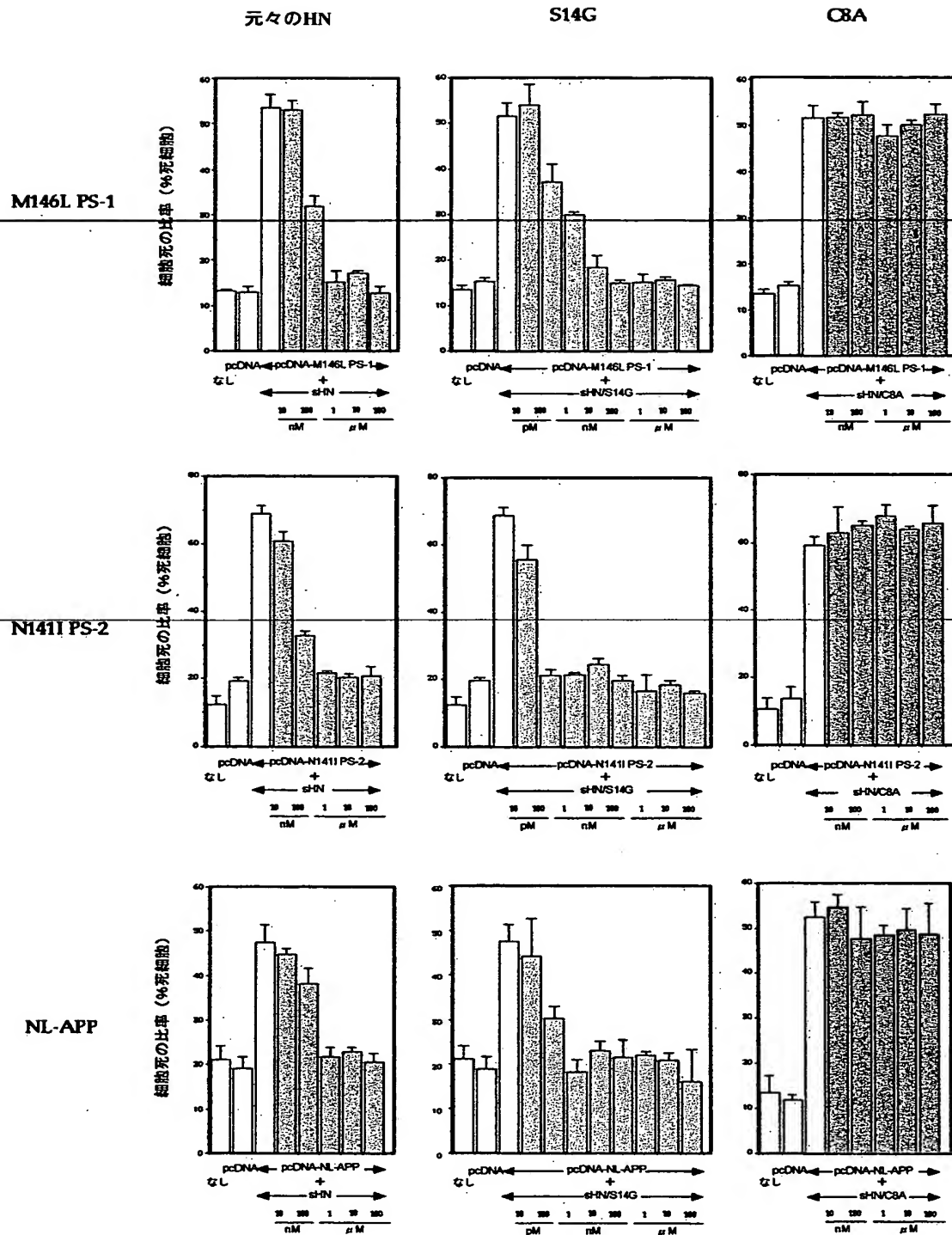
【図 7】



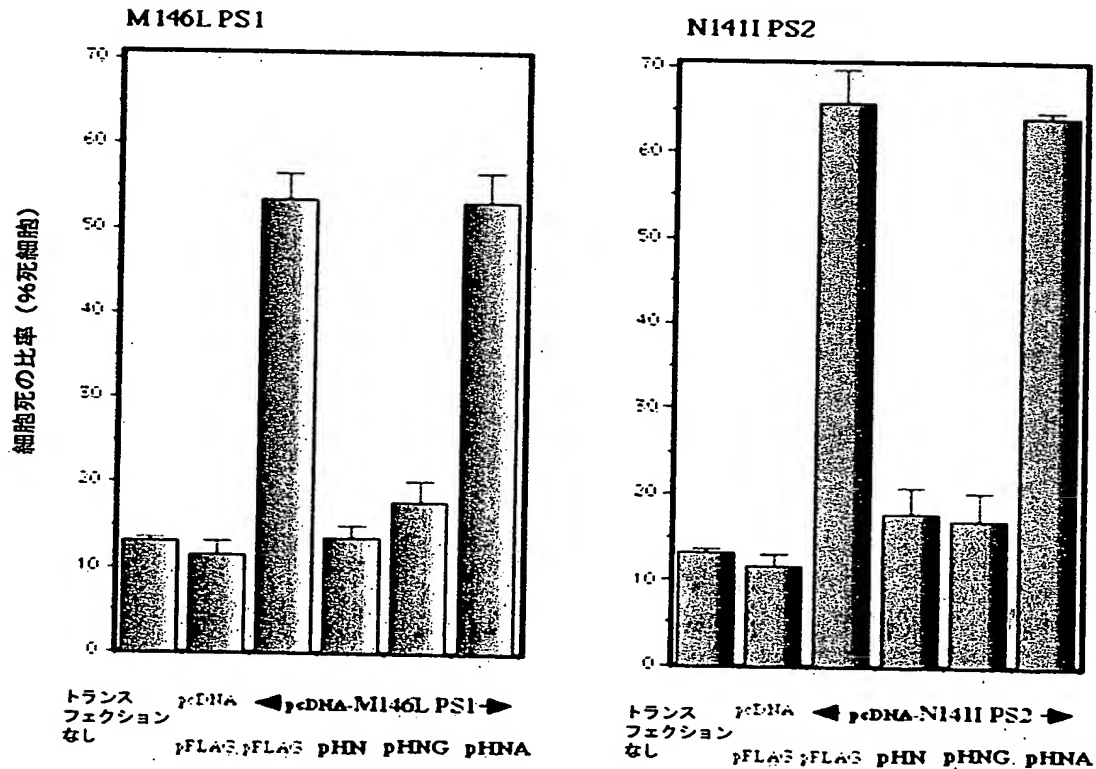
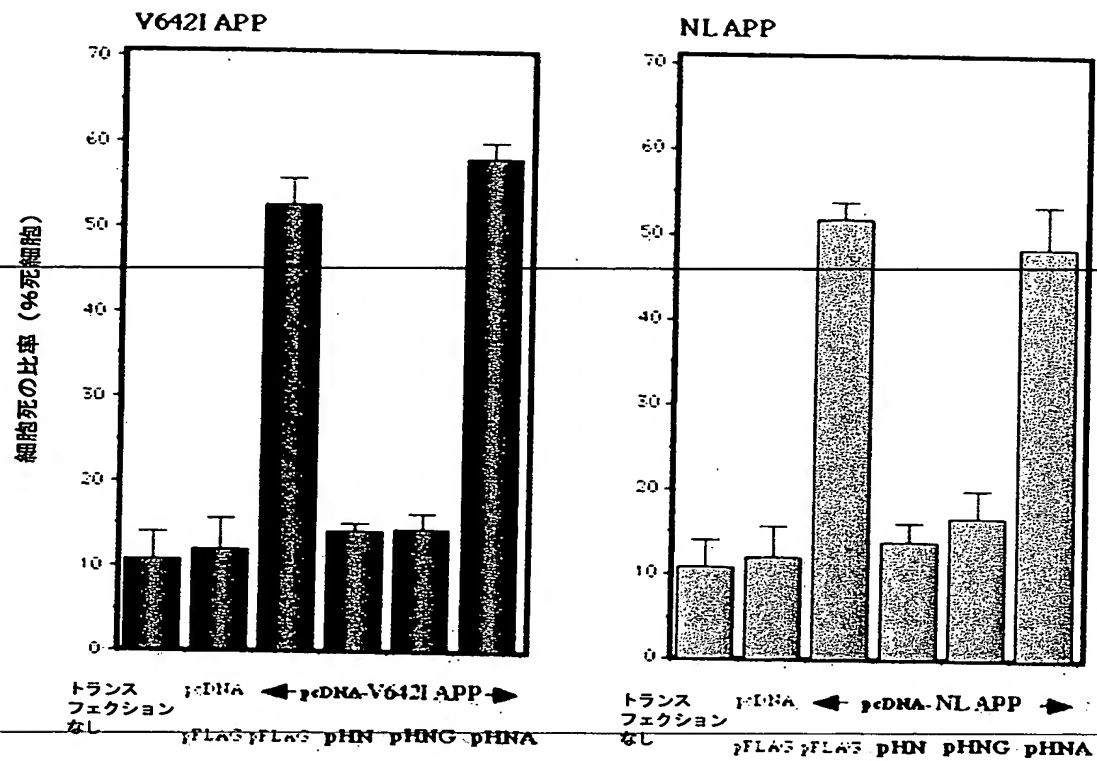
【図 8】



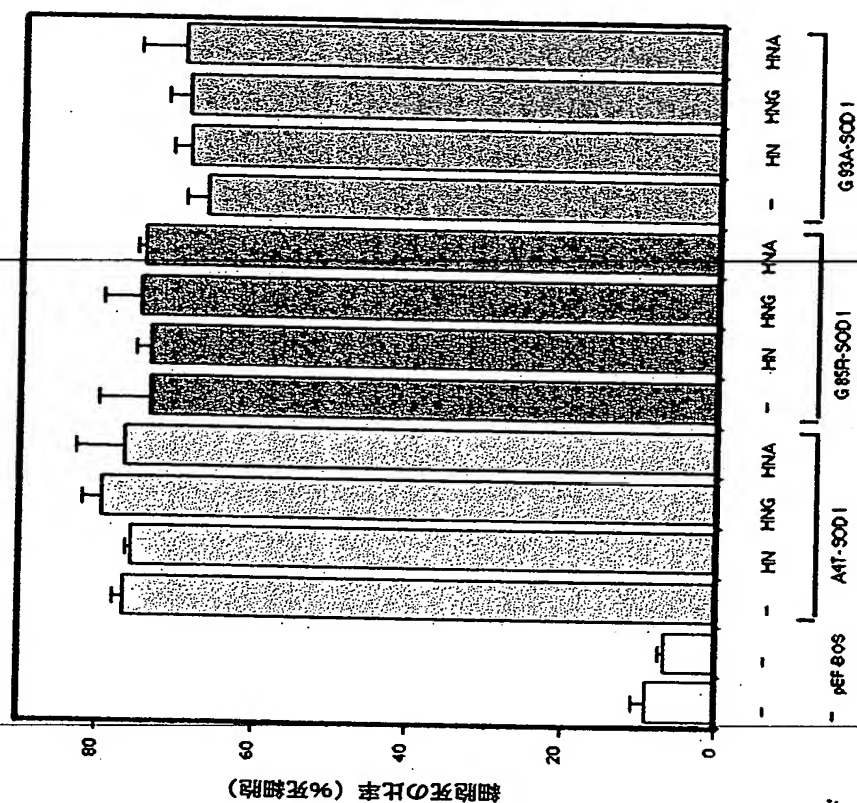
【図 9】



【図 10】

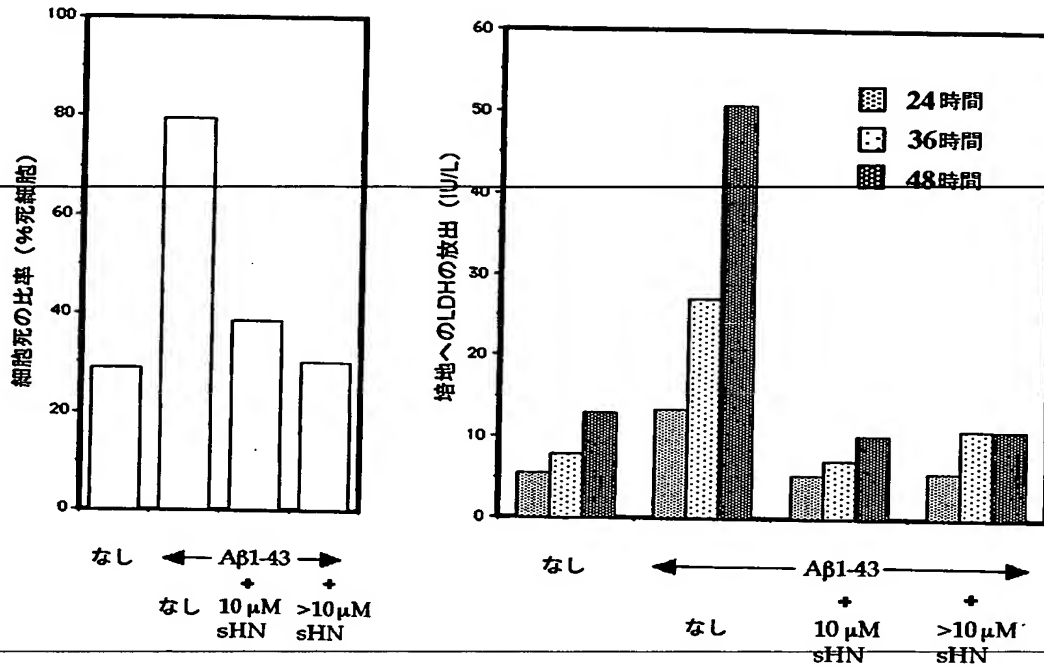


【図 11】

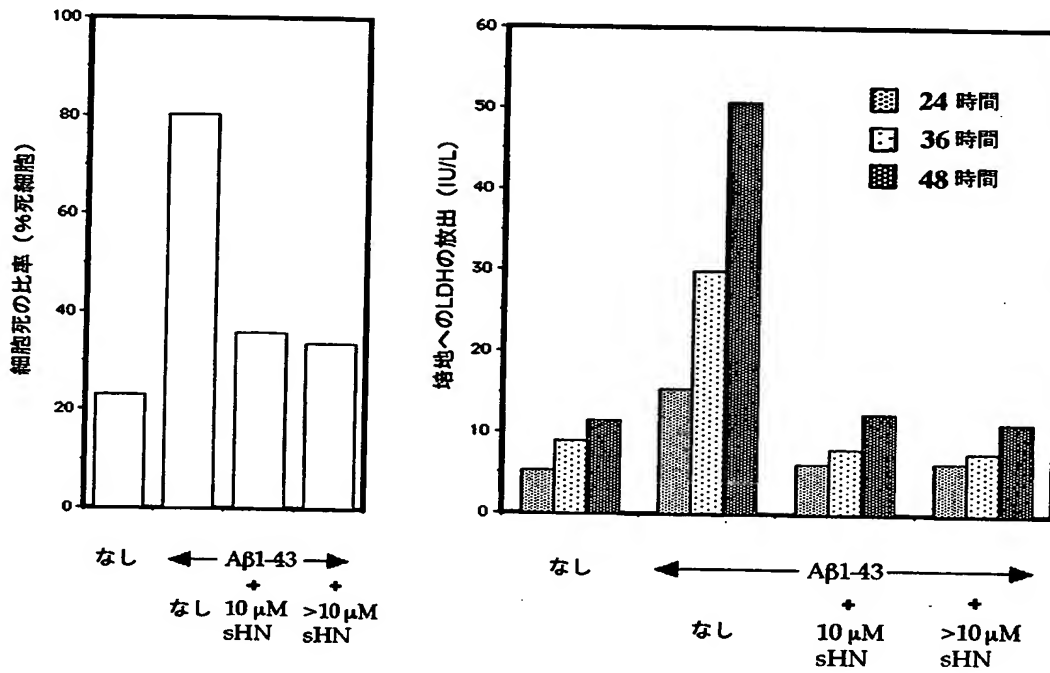


【図 1 3】

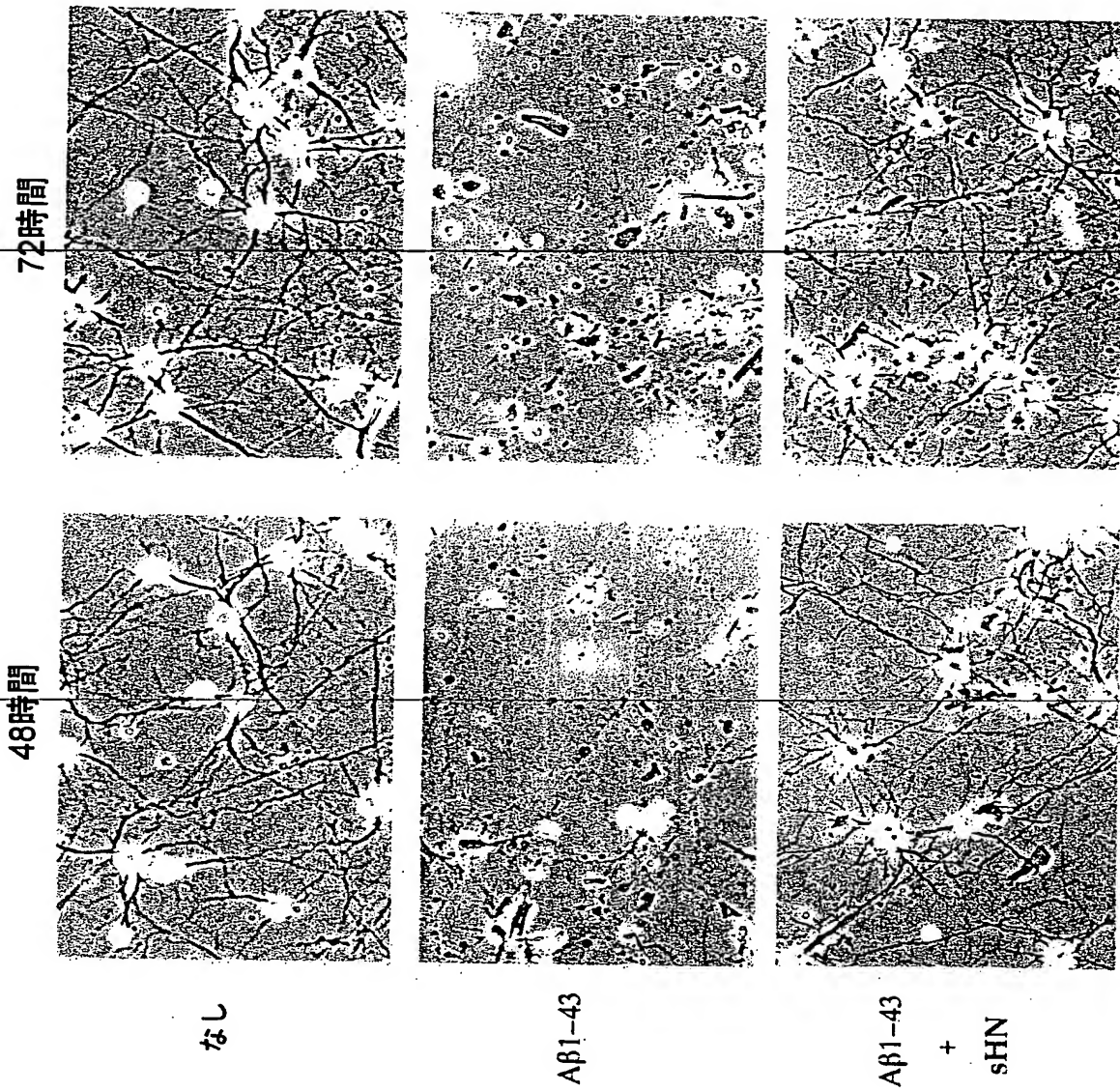
(a) N2 supplement (-)



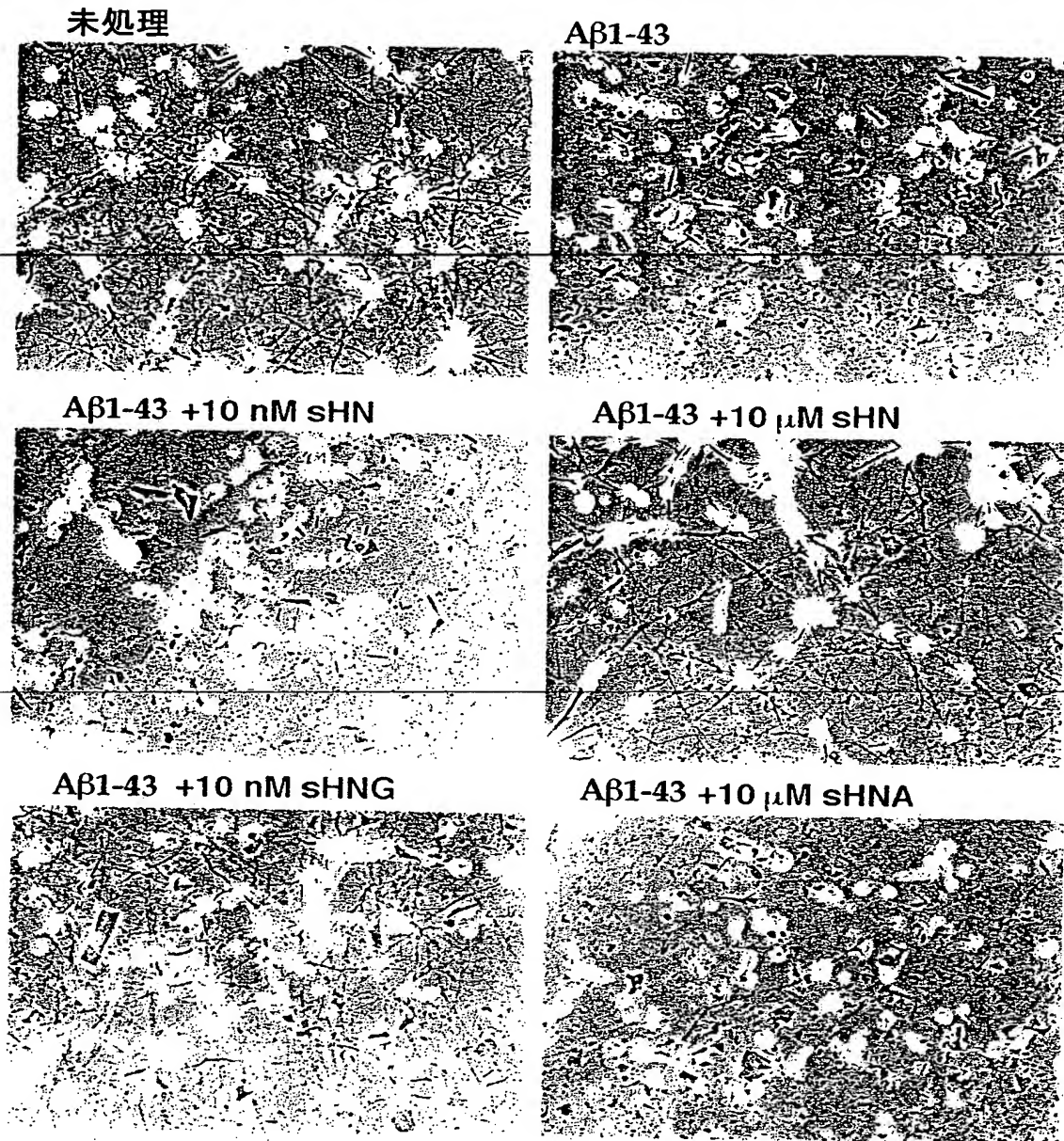
(b) N2 supplement (+)



【図 1 4】

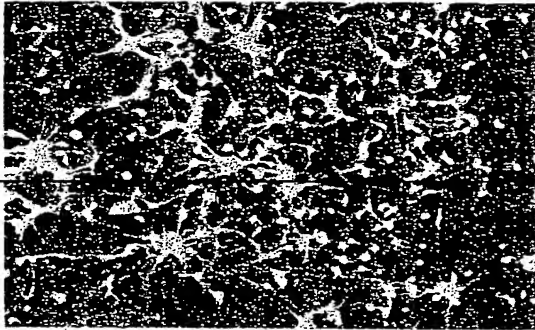


【図 1 5】

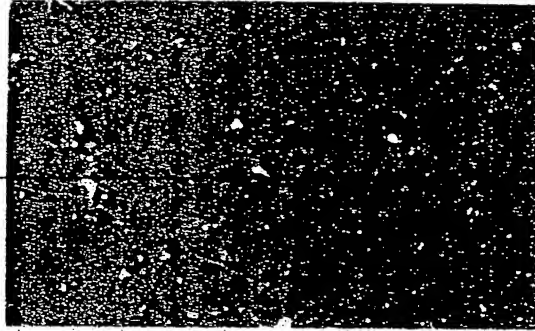


【图 1 6】

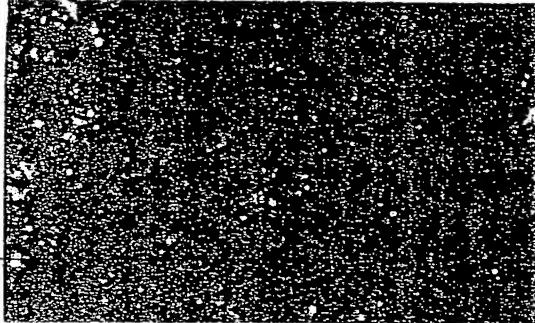
未处理



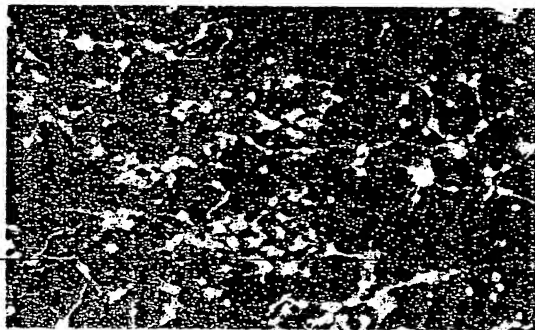
$A\beta$ 1-43



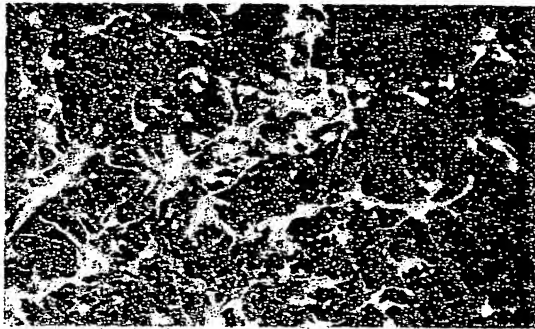
$A\beta$ 1-43 + 10 nM sHN



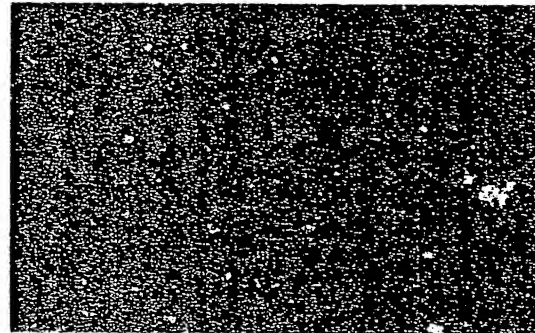
$A\beta$ 1-43 + 10 μ M sHN



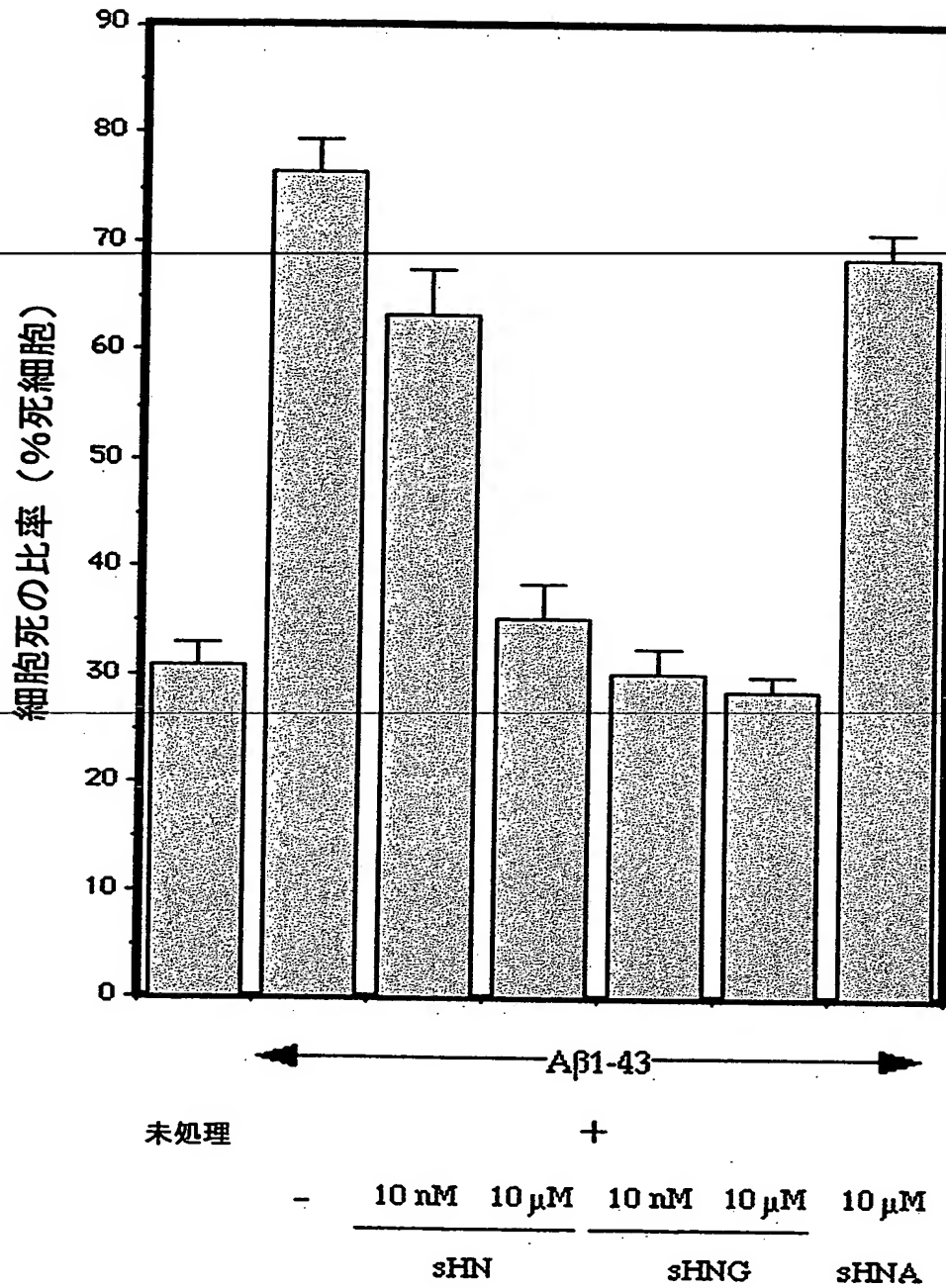
$A\beta$ 1-43 + 10 nM sHNG



$A\beta$ 1-43 + 10 μ M sHNA



【図 17】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 アルツハイマー病に関連する神経細胞死を抑制するポリペプチドの提供。

【解決手段】 エクダイソン処理により家族性アルツハイマー病変異APPの発現を誘導できる神経細胞系を用いて、該神経細胞を細胞死から保護する活性を有する遺伝子を単離することに成功した。該遺伝子は、24アミノ酸からなる分泌性のポリペプチドをコードしており、このポリペプチドは、APP変異体およびプレセニリン変異体の発現による神経細胞死を抑制する活性を示した。このポリペプチドはまた、初代神経培養の $A\beta$ による細胞死をも抑制した。また、ポリペプチドのアミノ酸を置換することにより、神経細胞死抑制活性を有意に上昇させることにも成功した。これらのポリペプチドおよびその誘導体は、アルツハイマー病に関連する神経細胞死を予防する医薬として、また新たなアルツハイマー病薬開発のためのリード化合物として有用である。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 9 8 1 2 1 3 4 1]

1. 変更年月日	1 9 9 8 年 9 月 4 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都港区三田二丁目 1 5 番 4 5 号
氏 名	学校法人慶應義塾

